

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición y Bromatología I
(Nutrición)



TESIS DOCTORAL

**Cacao y café, alimentos ricos en fitoquímicos con propiedades
beneficiosas en salud: estudios de biodisponibilidad de metilxantinas y
efectos en salud en voluntarios sanos y con riesgo cardiovascular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Martínez López

Directores

Laura Bravo Clemente,
Beatriz Sarriá Ruiz

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



Cacao y café, alimentos ricos en fitoquímicos con propiedades beneficiosas en salud.

Estudios de biodisponibilidad de metilxantinas y
efectos en salud en voluntarios sanos y con
riesgo cardiovascular.

Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por

Sara Martínez López

Bajo la dirección de las doctoras

Laura Bravo Clemente
Beatriz Sarriá Ruíz

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



Cacao y café, alimentos ricos en fitoquímicos con propiedades beneficiosas en salud.

Estudios de biodisponibilidad de metilxantinas y
efectos en salud en voluntarios sanos y con
riesgo cardiovascular.

Memoria presentada por **Sara Martínez López** para optar al grado de doctor por
la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



Cacao y café, alimentos ricos en fitoquímicos con propiedades beneficiosas en salud.

Estudios de biodisponibilidad de metilxantinas y efectos en salud en voluntarios sanos y con riesgo cardiovascular.

Memoria presentada por Sara Martínez López para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Vº Bº de las Directoras:

Dra. Laura Bravo Clemente

Dra. Beatriz Sarriá Ruiz

El Doctorando:

El Tutor:

Sara Martínez López

Ana María López Sobaler

La **Dra. Laura Bravo Clemente**, Profesora de Investigación, y la **Dra. Beatriz Sarriá Ruiz**, Titulado Superior, adscritas al Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICAN:

Que **Sara Martínez López** ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral que lleva por título “Cacao y café, alimentos ricos en fitoquímicos con propiedades beneficiosas en salud. Estudios de biodisponibilidad de metilxantinas y efectos en salud en voluntarios sanos y con riesgo cardiovascular”.

Y para que conste, se firma el presente informe en Madrid, a 14 de Julio de dos mil catorce,

Fdo: Laura Bravo Clemente

Fdo: Beatriz Sarriá Ruiz

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 562 29 00
FAX: 91 564 48 53



ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo en el marco de los proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación **AGL2010-18269** “Café verde y yerba mate como fuente dietética de ácidos hidroxycinámicos. Estudios *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (humanos) de biodisponibilidad y bioactividad” (2011-2014), de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, siendo el investigador responsable la Dra. Laura Bravo Clemente (ICTAN, CSIC), y **CSD2007-00063** “Nuevos ingredientes de alimentos funcionales para mejorar la salud (FUN-C-FOOD)” (2007-2014), del Programa CONSOLIDER-INGENIO 2010, siendo el investigador responsable el Dr. Francisco Tomás Barberán (CEBAS, CSIC).

Los estudios en humanos con productos solubles de cacao se realizaron con la financiación de dos contratos de investigación suscritos entre investigadores del Departamento de Metabolismo y Nutrición (Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición, ICTAN-CSIC) y la empresa Nutrexpa S.L. en el marco de los proyectos de investigación “Estudio del efecto en salud cardiovascular y hábitos intestinales de productos solubles de cacao. Evaluación en voluntarios sanos y en población de riesgo” (2008-2010) y “Estudio de la biodisponibilidad de polifenoles y metilxantinas en productos solubles de cacao y su efecto postprandial sobre parámetros del estado redox en voluntarios sanos” (2008-2010), siendo el investigador responsable de ambos contratos la Prof. Laura Bravo Clemente.

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca Predoctoral (JAE-Pre 097) del Programa Junta para la Ampliación de Estudios (JAE-PRE) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con la cofinanciación del Fondo Social Europeo a Sara Martínez López según la Resolución de convocatoria de 3 de Diciembre de 2008 (BOE 17 de Diciembre de 2008). Dentro del mismo Programa JAE, la concesión de una ayuda para Estancias Breves en centros de investigación de prestigio permitió la realización de una estancia en el Institute of Food Safety (Rikilt) de la Universidad de Wageningen (Holanda) bajo la supervisión del Dr. Peter C.H. Hollman durante los meses de Marzo-Mayo de 2011.

La empresa Nestle, S.A., ha facilitado el desarrollo del estudio en humanos con café proporcionando de forma gratuita el producto de café soluble GreenBlend®.

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”

(A. Machado)

A mi madre y mi abuela

AGRADECIMIENTOS

Me cuesta creer que por fin haya llegado el momento, después de estos años de esfuerzo, no sólo profesional, sino también personal porque hace 5 años decidí dejar mi ciudad para embarcarme en esta aventura. Pero también han sido años de grandes momentos que no habrían sido posibles sin la ayuda de mucha gente que de una manera u otra lo han hecho posible, y a la que hoy quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis Directoras de Tesis, Laura y Beatriz, porque sin ellas hoy no estaría aquí. Laura, muchas gracias por haber confiado en mí y haberme dado esta oportunidad, que sin duda nunca olvidaré, para entrar en el mundo de la investigación. Gracias por tu dedicación y por todo lo que me has enseñado, es mucho el aprendizaje que me llevo de ti. Beatriz, muchas gracias a ti también, por guiarme y llevarme de la mano a lo largo de este recorrido, por tu apoyo científico y moral, y por recordarme en los momentos de debilidad que con esfuerzo conseguiría mis metas.

Por estar siempre dispuesta a echarme una mano, por tu ayuda siempre que lo he necesitado, por tus consejos y por hacerme reír en tantas y tantas ocasiones, muchas gracias Raquel.

Esta Tesis tampoco habría sido posible sin los voluntarios, quienes también merecen su agradecimiento, así como Ana y los profesores J. L. Sierra y L. García-Diz, por estar siempre dispuestos a colaborar en los estudios y hacer este camino más fácil.

Me gustaría también mostrar mi agradecimiento a Luis porque eres excepcional y ha sido un placer tenerte cerca, tanto a nivel profesional como personal. A Sonia, gracias por muchas cosas, pero sobre todo por los abrazos y por el cariño con el que me has tratado siempre. Nines, me has hecho reír en muchas ocasiones, pero sobre todo agradezco tu apoyo en los momentos difíciles (incluidos los lunes muy lunes) y especialmente en esta última etapa.

Me gustaría agradecer a los doctores F. Saura, P. Ruipérez y B. Olmedilla, así como a M^a Rosa e Isabel Fernández-Conde, por sus palabras de ánimo y su interés.

También estoy más que agradecida a las futuras Doctoras. Miren, gracias por todo lo que has compartido conmigo de esta Tesis, y por el apoyo tanto en los buenos momentos y en los no tan buenos. Gema (que haciendo honor a tu nombre: eres una joya), Isa y Rocío, gracias por estar siempre dispuestas a escuchar, ayudar y darme vuestro cariño. Pero por supuesto no puedo olvidarme de la Dra. Pereira, la Dra. Arancibia y el Dr. Rodríguez-Ramiro, con los que tan buenos ratos pasé. También gracias a Miryam y M. Jesús por vuestras constantes palabras de ánimo.

Millones de gracias a mis cuatro soles porque nadie como vosotras ha sabido escucharme, entenderme, ayudarme, aconsejarme, hacerme sonreír y estar a mi lado, incluso a pesar de las distancias: Elena, Marta, Paquita, Rosana... no sé qué haría sin vosotras! Pero tampoco me puedo olvidar de tanta otra gente maja del ICTAN. De los que están: Jara, José Manuel, María Blanch, Fragarita, Marisa, Ailén, Nacho, Lucía, Fernando, y un largo etc.; y de los que

estuvieron: Ben, Gema A., Giselle, Pilar G., Isómero y Montse. Y por supuesto, a las “biercoleras” Irene y Ainhoa que tan bien me acogieron en Wageningen. Y una mención especial a Gloria Márquez, porque vales mucho y me has dado mucha fuerza. Muchas gracias por los momentos inolvidables con todos y cada uno de vosotros.

Gracias también a mis “three little birds” Rubén, Miquel y Miguel que fueron grandes compañeros BdG, y a aquellos que se cruzaron en este camino, y que aún siguen en él, como Arancha, Nina, Víctor Mesías, etc. No me olvido del Xavi y el Raúl... us vaig trobar en un altre camí, però des de llavors no heu deixat de caminar al meu costat.

Y, por supuesto, a mis murcianicos, que han estado tan cerca y tan lejos: a mis primicas “*prefes*” y mis tíos, Andrea, Víctor, las Achas, La María, El Diego, La Consu, El Pelli, La Elena... Tenemos que recuperar el tiempo perdido, y podríamos empezar con una Estrellica de Levante y una marinera con cada uno de vosotros porque sois los mejores.

A mi Raulico, por cuidarme y mimarme tanto, por querer estar a mi lado en los buenos y en los malos momentos y por no dejarme caer antes de llegar a la meta. Gracias por tu paciencia. Eres muy importante para mí, y te mereces mucho de esta Tesis.

Y, finalmente, me gustaría agradecerte que hayas estado a mi lado no sólo a lo largo de esta etapa, sino a lo largo de toda mi vida. Porque has sido y eres mi mayor apoyo, porque has luchado por mis sueños como si fueran los tuyos, y si no fuera por ti hoy no estaría aquí. Te quiero, Mamá.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAMU 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracilo

AFMU 5-acetilamino-6-formilamino -3- metiluracilo

AAPH 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro

AMMU 6-amino-5(N-metilformilamino)-1-metiluracilo

ABC ATP binding cassette

ABTS Ácido 2,2'-azobis (3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico)

AGCC Ácidos grasos de cadena corta

ALT Alanino aminotransferasa

AN Azúcares neutros

Apo Apolipoproteína

AST Aspartato aminotransferasa

AU Ácidos urónicos

C Colesterol

CA Ácido cafeico

CAO Capacidad antioxidante

CC Cacao control

CC-FD Cacao rico en fibra dietética

CC-MX Cacao rico en polifenoles y metilxantinas

CC-PF Cacao rico en polifenoles

CF Cafeína

C_{max} Concentración máxima

COX Ciclo-oxigenasa

CQA Ácido cafeoilquínico

CT Colesterol total

CYP Citocromo P 450

DAD Detector de diodos array

DNA Ácido desoxirribonucleico

EC Epicatequina

ECV Enfermedad cardiovascular

EDTA Ácido etilendiaminetetracético

EFSA Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

eNOS Óxido nítrico sintasa endotelial

FA Ácido ferúlico

FC Frecuencia cardiaca

FD Fibra dietética

FI Fibra dietética insoluble

FQA Ácido feruloilquínico

FRAP Poder antioxidante/reductor del hierro

FS Fibra dietética soluble

GAE Equivalentes de ácido gálico

GC Grupos carbonilo

G-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos

GIP Péptido inhibidor gástrico

GLP-1 Péptido similar al glucagón tipo 1

GLUT Transportador de glucosa

GM-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HDL Lipoproteína de alta densidad

HHQ Hidroxihidroquinona

HOMA Evaluación del modelo de homeostasis

HOMA- β Índice HOMA de función de células β pancreáticas

HOMA-IR Índice HOMA de resistencia a insulina

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

IDL lipoproteína de densidad intermedia

IFN- γ Interferón gamma

IL Interleuquina

IMC Índice de masa corporal

LDL Lipoproteína de baja densidad

LDL-ox Lipoproteína de baja densidad oxidada

LK Lignina Klason

MCP-1 Proteína quimioatrayente de monocitos-1

MDA Malondialdehído

MIP-1 β Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta

MU Ácido metilúrico

MX Metilxantina

NF- κ B Factor de transcripción nuclear κ B

NO Óxido nítrico

OMS Organización Mundial de la Salud

ORAC Capacidad antioxidante de radicales oxígeno

PA Presión arterial

PAI-1 Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PCR Proteína C reactiva

PX Paraxantina

QUICKI Índice de chequeo cuantitativo de sensibilidad a insulina

Q-TOF Cuadrupolo tiempo de vuelo

SGLT Transportador de glucosa dependiente de sodio

sICAM-1 Molécula de adhesión intercelular soluble

SNC Sistema nervioso central

SPE Extracción en fase sólida

SR-BI receptor scavenger tipo BI

sVCAM-1 Molécula de adhesión vascular soluble

TB Teobromina

TE Equivalentes de Trolox

TG Triglicéridos

T_{max} Tiempo de máxima concentración

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

TP Teofilina

TPTZ tripiridil s-triazina

UNH Unidad de Nutrición Humana

UV Ultravioleta-visible

VLDL Lipoproteína de muy baja densidad

ÍNDICE

1. Resumen/Summary	1
2. Introducción general	7
2.1. Salud Cardiovascular	9
2.1.1. Dislipemia	12
2.1.2. Hipertensión arterial	13
2.1.3. Obesidad	14
2.1.4. Diabetes mellitus tipo 2	17
2.2. Fibra dietética	18
2.2.1. Definición y aspectos generales	18
2.2.2. Clasificación	19
2.2.3. Ingestas y consumo recomendado	20
2.2.4. Propiedades fisiológicas	21
2.2.5. Efectos en salud	22
2.2.5.1. Enfermedades cardiovasculares	22
2.2.5.2. Enfermedades gastrointestinales	23
2.2.5.3. Obesidad	24
2.2.5.4. Diabetes	24
2.2.5.5. Cáncer de colon	25
2.3. Polifenoles	26
2.3.1. Definición y aspectos generales	26
2.3.2. Clasificación	26
2.3.3. Los polifenoles en la dieta y su ingesta	32
2.3.4. Biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles en la dieta	33
➤ Niveles plasmáticos de polifenoles	39
➤ Excreción urinaria de polifenoles	40
2.3.5. Propiedades fisiológicas e implicaciones en salud	42
2.3.5.1. Enfermedades cardiovasculares	43
2.3.5.2. Diabetes y Obesidad	44
2.3.5.3. Enfermedades neurodegenerativas	46
2.3.5.4. Cáncer	46

2.4.	Metilxantinas	47
2.4.1.	Definición y aspectos generales	47
2.4.2.	Clasificación	47
2.4.3.	Las metilxantinas en la dieta y su ingestas	49
2.4.4.	Biodisponibilidad y metabolismo de las metilxantinas en la dieta ...	49
	➤ Niveles plasmáticos de metilxantinas	53
	➤ Excreción urinaria de metilxantinas	55
2.4.5.	Propiedades fisiológicas y efectos en salud	56
2.4.5.1.	Enfermedades cardiovasculares	57
2.4.5.2.	Sistema Nervioso Central	57
2.4.5.3.	Sistema Renal	58
2.4.5.4.	Sistema Respiratorio	58
2.4.5.5.	Otros efectos fisiológicos	58
2.5.	Fuentes dietéticas de fibra dietética, polifenoles y metilxantinas	59
2.5.1.	Cacao	59
2.5.1.1.	Generalidades sobre el cacao	59
2.5.1.2.	Consumo	60
2.5.1.3.	Composición química	60
2.5.1.4.	Efectos fisiológicos e implicaciones en salud	62
	2.5.1.4.1. Salud Cardiovascular	65
	2.5.1.4.2. Inflamación	69
	2.5.1.4.3. Obesidad y diabetes mellitus tipo 2	70
	2.5.1.4.4. Sistema Nervioso Central	72
	2.5.1.4.5. Cáncer	72
2.5.2.	Café	73
2.5.2.1.	Generalidades sobre el café	73
2.5.2.2.	Consumo	73
2.5.2.3.	Composición química	74
2.5.2.4.	Efectos en salud	75
	2.5.2.4.1. Salud Cardiovascular	80
	2.5.2.4.2. Inflamación	84

2.5.2.4.3.	Estrés oxidativo	85
2.5.2.4.4.	Obesidad y diabetes mellitus tipo 2	86
2.5.2.4.5.	Sistema Nervioso Central	88
2.5.2.4.6.	Cáncer	89
3.	Hipótesis y objetivos generales	91
4.	Material y Métodos	97
4.1.	Productos de estudio	99
4.1.1.	Cacao	99
4.1.1.1.	Estudios crónicos	99
4.1.1.2.	Estudios agudos	100
4.1.2.	Café	101
4.2.	Reactivos	101
4.2.1.	Análisis de alimentos	101
4.2.2.	Análisis de muestras biológicas	102
4.3.	Instrumentación	103
4.4.	Caracterización de los productos de estudio	104
4.4.1.	Determinación de humedad y grasa	104
4.4.2.	Determinación de fibra dietética	105
4.4.3.	Caracterización de polifenoles y metilxantinas	107
4.4.3.1.	Extracción orgánica-ácida	107
4.4.3.2.	Caracterización de polifenoles	107
4.4.3.3.	Caracterización de metilxantinas	109
4.4.4.	Determinación de la capacidad antioxidante	112
4.4.4.1.	Ensayo ORAC (Oxygen Radical Scavenging Capacity)	112
4.4.4.2.	Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	112
4.4.4.3.	Ensayo ABTS	113
4.5.	Ensayos clínicos de intervención	114
4.5.1.	Estudios de consumo agudo	115
4.5.1.1.	Cacao	116

4.5.1.2. Café	118
4.5.2. Estudios de consumo crónico	120
4.5.2.1. Cacao	122
4.5.2.2. Café	124
4.6. Medidas antropométricas	126
4.7. Cuestionarios	127
4.7.1. Cuestionarios de actividad física	127
4.7.2. Cuestionarios dietéticos	128
4.8. Determinación de metilxantinas en muestras biológicas	128
4.8.1. Extracción de metilxantinas de plasma y orina	128
4.8.2. Análisis e identificación de metilxantinas	129
4.9. Determinaciones bioquímicas y hematológicas	133
4.10. Determinaciones de capacidad antioxidante y daño oxidativo a macromoléculas en suero	134
4.10.1. Capacidad antioxidante	134
4.10.2. Daño a lípidos. Determinación de malondialdehído	134
4.10.3. Daño a proteínas. Determinación de grupos carbonilos	135
4.11. Determinaciones de biomarcadores de inflamación	135
4.11.1. Estudio crónico Cacao-Salud	135
4.11.2. Estudio crónico Café-Infu-Salud	136
4.12. Determinación de glucosa y cálculo de índices de resistencia a insulina	136
4.13. Estadística	137
4.14. Tablas de ingesta	138
5. Resultados	141
5.1. Biodisponibilidad de metilxantinas	143
5.1.1. Resumen	145
5.1.2. Artículo 1: Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. Martínez-López, S., Sarriá, B., Gómez-Juaristi,	

M., Goya, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). <i>Food Research International</i> . En prensa. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.03.009.	149
5.1.3. Artículo 2: Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. Martínez-López, S., Sarriá, B., Baeza, G., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). <i>Food Research International</i> , 64, 125-133.	161
5.2. Efectos en salud de productos solubles de cacao	173
5.2.1. Resumen	175
5.2.2. Artículo 3: Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults. Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J. L., García-Diz, L., Mateos, R., & Bravo, L. (2013). <i>British Journal of Nutrition</i> , 111(1), 122-134.	177
5.2.3. Artículo 4: Realistic intake of a flavanol-rich soluble cocoa product increases HDL-cholesterol without inducing anthropometric changes in healthy and moderately hypercholesterolemic subjects. Martínez-López, S., Sarriá, B., Sierra-Cinos, J. L., García-Diz, L., Goya, L., Mateos, R., & Bravo, L. (2014). <i>Food and Function</i> , 5(2), 364-374.	193
5.2.4. Artículo 5: Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans. Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J. L., García-Diz, L., Mateos, R., & Bravo, L. (2013). En revisión.	207
5.3. Efectos en salud de un producto soluble de café mezcla tostado/verde	235
5.3.1. Resumen	237
5.3.2. Efecto del consumo de una bebida soluble de café conteniendo café verde en parámetros cardiometabólicos en voluntarios sanos y en población de riesgo	241
5.3.2.1. Resultados	243
5.3.2.1.1. Ingestas dietéticas	243
5.3.2.1.2. Antropometría	244

5.3.2.1.3. Actividad física	246
5.3.2.1.4. Presión arterial y frecuencia cardiaca	247
5.3.2.1.5. Bioquímica	248
5.3.2.1.6. Inflamación	251
5.3.2.1.7. Biomarcadores de estado oxidativo	258
5.3.2.1.8. Glicemia y la resistencia a la insulina	262
5.3.2.2. Discusión	264
5.3.2.2.1. Parámetros antropométricos	264
5.3.2.2.2. Presión arterial y frecuencia cardiaca	267
5.3.2.2.3. Lipemia	269
5.3.2.2.4. Inflamación	271
5.3.2.2.5. Estado oxidativo	275
5.3.2.2.6. Glicemia y la resistencia a la insulina	277
6. Discusión integradora	281
6.1. Biodisponibilidad de metilxantinas	283
6.2. Salud cardiovascular	293
7. Conclusiones	307
8. Bibliografía	313
9. Anexos	371
9.1. Anexo 1: Listado de alimentos prohibidos, restringidos y permitidos durante los estudios crónicos Cacao-Salud y Café-Infu-Salud	373

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de la homeostasis vascular dependiente de óxido nítrico	10
Figura 2. Biomarcadores de inflamación en el proceso aterosclerótico	11
Figura 3. Respuesta inflamatoria asociada a la obesidad	15
Figura 4. Mecanismos protectores de los ácidos grasos poliinsaturados	16
Figura 5. Estructuras de algunos ácidos fenólicos	28
Figura 6. Estructuras de algunos polifenoles flavonoides	29
Figura 7. Estructuras de algunos alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos	31
Figura 8. Absorción y metabolización de polifenoles en el organismo humano	36
Figura 9. Ruta de degradación de procianidinas	38
Figura 10. Estructura química de metilxantinas y ácidos metilúricos	48
Figura 11. Rutas metabólicas derivadas de la cafeína	52
Figura 12. Cromatograma de un extracto de cacao para determinación de metilxantinas y polifenoles	111
Figura 13. Esquema correspondiente a una etapa del estudio de biodisponibilidad CACAO-BIO	118
Figura 14. Esquema del estudio de biodisponibilidad CAFÉ-INFU-BIO	120
Figura 15. Esquema general del estudio de consumo crónico CACAO-SALUD	124
Figura 16. Esquema general del estudio de consumo crónico Café-Infu-Salud	126
Figura 17. Equipo HPLC-DAD-ESI-QTOF serie 1200 Agilent (Agilent Technologies)	131
Figura 18. Efecto del consumo regular del café mezcla tostado/verde en el peso y el porcentaje de grasa corporal	246
Figura 19. Efecto del consumo regular del café mezcla tostado/verde en los niveles de presión arterial sistólica y diastólica y frecuencia cardiaca	248

Figura 20. Efecto del consumo regular del café mezcla tostado/verde en los niveles de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de muy baja densidad y triglicéridos	251
Figura 21. Efecto del consumo regular del café mezcla tostado/verde en la capacidad antioxidante del suero, medida por las técnicas ORAC, FRAP y ABTS	260
Figura 22. Efecto del consumo regular del café mezcla tostado/verde en la concentración de malondialdehído y de grupos carbonilos	261
Figura 23. Concentraciones máximas de los distintos metabolitos detectados en plasma tras el consumo de cacao, cacao rico en metilxantinas y café	285
Figura 24. Correlación entre la ingesta total de teobromina y cafeína con la concentración de estas metilxantinas en plasma y orina tras el consumo de cacao, cacao rico en metilxantinas y café	286
Figura 25. Valores de T_{\max} de los distintos metabolitos identificados en plasma tras el consumo de cacao, cacao rico en metilxantinas y café	289
Figura 26. Concentraciones máximas de los distintos metabolitos urinarios tras el consumo de cacao, cacao rico en metilxantinas y café	289
Figura 27. Valores de T_{\max} de los distintos metabolitos identificados en orina tras el consumo de cacao, cacao rico en metilxantinas y café	292
Figura 28. Esquema del metabolismo de CF en plasma y orina tras la ingesta aguda del producto de café	296
Figura 29. Variaciones de los distintos biomarcadores lipídicos determinados tras el consumo regular de cacao enriquecido en polifenoles, cacao enriquecido en fibra dietética y café	298
Figura 30. Variaciones en la capacidad antioxidante y el daño oxidativo a lípidos y proteínas tras el consumo regular de cacao enriquecido en polifenoles, cacao enriquecido en fibra dietética y café	303
Figura 31. Cantidad de fibra dietética total ingerida durante las intervenciones con los productos de cacao y el producto de café verde	305

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de fibra dietética total, fibra soluble y fibra insoluble de algunos alimentos de la dieta	21
Tabla 2. Polifenoles totales encontrados en diferentes alimentos y bebidas	32
Tabla 3. Fuentes alimentarias y cantidad de polifenoles totales mayoritariamente ingeridos por la población española	33
Tabla 4. Composición de metilxantinas en diferentes alimentos	49
Tabla 5. Composición nutricional de cacao y productos derivados por cada 100 g de producto	61
Tabla 6. Estudios en humanos de los efectos saludables del cacao y el chocolate	63
Tabla 7. Estudios en humanos de los efectos saludables del café	77
Tabla 8. Determinación de la humedad y la grasa en los productos de cacao	105
Tabla 9. Contenido en fibra dietética total	106
Tabla 10. Cuantificación de polifenoles y flavonoides de los productos de cacao.....	108
Tabla 11. Cuantificación de polifenoles y ácidos hidroxicinámicos de la bebida de café mezcla tostado/verde	109
Tabla 12. Comparación de tres métodos de extracción de metilxantinas en productos de cacao	110
Tabla 13. Determinación de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) en los extractos de cacao y en la infusión de café	111
Tabla 14. Determinación de la capacidad antioxidante de los productos de estudio ...	114
Tabla 15. Características basales de los individuos que participaron en el estudio de CACAO-BIO	117
Tabla 16. Características basales de los individuos que participan en el estudio de biodisponibilidad CAFÉ-INFU-BIO	119
Tabla 17. Características basales de los participantes en el estudio CACAO-SALUD ...	123

Tabla 18. Características basales de los participantes en el estudio CAFÉ-INFU-SALUD	125
Tabla 19. Características físico-químicas de las metilxantinas y ácidos metilúricos	130
Tabla 20. Condiciones de análisis por espectrometría de masas QTOF	132
Tabla 21. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de las metilxantinas y ácidos metilúricos	133
Tabla 22. Dosis de los productos de cacao y café mezcla tostado/verde consumidos en los estudios de biodisponibilidad y cantidad de metilxantinas ingeridas	138
Tabla 23. Dosis de los productos de cacao y de café mezcla tostado/verde consumidos en los estudios crónicos y aporte diario de fibra dietética, polifenoles, metilxantinas y diterpenos	139
Tabla 24. Ingesta de energía y macronutrientes durante el estudio con el producto de café mezcla tostado/verde	244
Tabla 25. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en los parámetros antropométricos	245
Tabla 26. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en el gasto energético total	246
Tabla 27. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en la presión arterial sistólica y diastólica y la frecuencia cardíaca	247
Tabla 28. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en parámetros bioquímicos del perfil lipídico y función hepática	249
Tabla 29. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en los niveles de proteína C reactiva	252
Tabla 30. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en interleuquinas de activación general	253
Tabla 31. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en citoquinas relacionadas con células Th1 (IL-12 e IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), Th17 (IL-17) y células reguladoras T (IL-10) del sistema inmune	254

Tabla 32. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en citoquinas y factores hematopoyéticos de la médula ósea	255
Tabla 33. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en quimioquinas	256
Tabla 34. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en las moléculas de adhesión	256
Tabla 35. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en las adipoquinas y la grelina	257
Tabla 36. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en la capacidad antioxidante del suero	259
Tabla 37. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en el daño oxidativo a lípidos y proteínas	261
Tabla 38. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en la glicemia e insulinemia en ayunas y en índices de resistencia/sensibilidad a la insulina y función pancreática	263
Tabla 39. Alimentos no permitidos, restringidos y permitidos durante el estudio crónico CACAO-SALUD	373
Tabla 40. Alimentos no permitidos, restringidos y permitidos durante el estudio crónico CAFÉ-INFU-SALUD	374

SUMMARY

TITLE

Cocoa and coffee, food rich in phytochemicals with beneficial properties in health. Bioavailability studies of methylxanthines and health effects on healthy and with cardiovascular risk volunteers.

INTRODUCTION

A large number of studies support the cardiovascular protective effects of the Mediterranean diet. However, the Mediterranean population, including the Spanish, is changing its lifestyle and the incidence of cardiovascular disease and associated pathologies is increasing. Nowadays, the food industry is manufacturing new products adding functional ingredients, such as dietary fibre, polyphenols or methylxanthines, which may contribute to increase functional food's beneficial health effects. It is well-known that dietary fiber helps to maintain healthy gastro-intestinal habits, in addition to preventing cardiovascular diseases and metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes. Polyphenols are an important group of phytochemicals which contribute to improve cardiovascular health due to their antioxidant, anti-inflammatory, hypocholesterolemic and hypotensive properties, having also shown preventive effects on diabetes, obesity, cancer or neurodegenerative disorders. However, the knowledge on the health effects of methylxanthines contained in food is scarce. Although these alkaloids have been traditionally associated to negative properties, recently caffeine has shown positive effects on obesity and cognitive function, and theobromine has shown hypoglycemic and hypocholesterolemic effects.

Cocoa and coffee, two of the most consumed beverages in our society, are rich in phytochemicals. Cocoa contains high amounts of three bioactive compounds: polyphenols (mainly, flavanol monomers and procyanidins), methylxanthines (theobromine) and dietary fiber. Soluble cocoa products are highly accepted in different population groups (children, adults, etc.), the supplementation of these products with their own functional ingredients could increase their beneficial health properties. Similarly, coffee is rich in phytochemicals, including polyphenols (mainly, hydroxycinnamic derivatives) and methylxanthines (caffeine) among others. The manufacturing of coffee products reduces the bioactive content of the coffee bean, especially in polyphenols, by reducing the roasting coffee may maintain its

concentration in hydroxycinnamic acids, and therefore its beneficial health effects. Green coffee is a healthier alternative to roasted coffee due to its higher polyphenolic composition; however, in order to maintain the characteristic aroma of roasted coffee, this beverage is being commercialized as a mixture of both green and roasted coffee.

The health benefits attributed to these products depend essentially on the bioavailability of the bioactive components they contain. The majority of the human intervention studies evaluating the bioavailability of phytochemicals and the benefits derived from the consumption of cocoa and coffee have used high amounts of these foods.

OBJECTIVES AND RESULTS

The general objective of the present Doctoral Thesis was to evaluate the health effects of consuming low, realistic doses of cocoa and coffee products which are commonly accepted by consumers. Therefore, the beneficial cardiovascular effects associated with the bioactive components in cocoa and in coffee have been evaluated in human chronic studies, in both healthy and moderately hypercholesterolemic subjects, using similar doses to those habitually ingested by consumers. Simultaneously, the absorption and metabolism of methylxanthines in soluble cocoa products, naturally present or after supplementation, and in coffee have also been evaluated by pharmacokinetic studies in healthy individuals.

The regular consumption of soluble cocoa products enriched in dietary fiber or polyphenols during 4 weeks increased the daily intake of cocoa's bioactive ingredients, improved the lipid profile in healthy and hypercholesterolemic subjects, increasing significantly serum HDL-cholesterol levels, without affecting total cholesterol or other serum lipids. The two cocoa products produced a slight anti-inflammatory effect, and showed a tendency to reduce adhesion molecules and other inflammation biomarkers. These beneficial health effects are associated to their content in flavanols, procyanidins, theobromine and dietary fiber. In addition, the fiber-rich cocoa reduced blood glucose levels. Neither of the studied products induced weight gain or any negative anthropometric effect, and did not affect the blood pressure or the antioxidant capacity of the serum of volunteers.

Similarly to cocoa supplementation, the consumption of a soluble coffee product containing 35% green coffee, and therefore an elevated content in polyphenols, mainly hydroxycinnamic acids, increased the intake of antioxidants compounds. The regular and moderate consumption of this product significantly improved the lipid profile, reducing

total, LDL, and VLDL cholesterol and triglyceride levels in hypercholesterolemic subjects, without affecting other serum lipids. In addition, both healthy and hypercholesterolemic subjects statistically reduced their blood pressure, heart rate, and oxidative damage in serum lipids and proteins (determined as malondialdehyde and carbonyl groups, respectively) and also increased the antioxidant power in serum of all the volunteers. Green-roasted coffee consumption reduced also glucose levels and insulin resistance in healthy and Hypercholesterolemic subjects. Inflammation biomarkers were not affected after the coffee intervention, excepting C-reactive protein, which significantly decreased in both groups of volunteers.

Moreover, the regular consumption of the roasted-green coffee product in realistic doses decreased the weight and the percentage of body fat in both study groups which may be related to the observed decrease of several adipokines, being these effects slightly more pronounced in hypercholesterolemic subjects. Although symptoms of hunger or satiety were not evaluated through questionnaires, food intake and energy expenditure were and these parameters did not changed along the study. Attending to these results, coffee could help not only to improve the cardiovascular health, but also to prevent other pathologies such as obesity and type 2 diabetes.

Regarding the methylxanthine bioavailability studies, a chromatographic method was developed to identify and quantify methylxanthines and methyluric acids in biological samples with a minimum sample preparation, allowing the separation of 12 analytes by liquid chromatography with diode-array detector (HPLC-DAD) and mass spectrometry detectors (LC-ESI-QTOF) with good resolution. Theobromine and caffeine, the major methylxanthines in cocoa and coffee, respectively, were extensively absorbed and rapidly metabolized to other methylxanthines and methyluric acids. Theobromine and 7-methylxanthine were the main metabolites observed in plasma and urine samples after consuming both cocoa products, besides showing a dose-dependent response. Caffeine was found in plasma 30 minutes after coffee supplementation, being its main metabolite paraxanthine, the major compound absorbed in plasma whereas the major compound found in urine was its derivate 1-methyluric acid.

CONCLUSIONS

Methylxanthines theobromine and caffeine, naturally present in cocoa and coffee products, or supplemented in cocoa, are highly available and metabolized to other methylxanthines and methyluric acids derivatives, showing a dose-dependent response.

The regular and moderate consumption of soluble cocoa products improves the lipid profile, and the fiber rich product also induces hypoglycemic effects, in both

healthy and hypercholesterolemic humans without leading to other negative effects such as weight gain. The consumption of the green-roasted coffee, in addition to improving lipid profile in hypercholesterolemic subjects, shows positive effects on blood pressure, antioxidant capacity, weight, and body composition in both groups, being these effects more noticeable in the cardiovascular risk subjects. The benefits observed after cocoa consumption are associated to its content in flavanols and dietary fiber, whereas in the green/toasted coffee product the hydroxycinnamic derivatives are the compounds which are mainly responsible for the health effects observed.

It may be concluded that consuming realistic amounts of the cocoa and coffee products here studied within a healthy diet induces cardioprotective effects in healthy and cardiovascular risk populations and thus contributes to a healthy lifestyle.

INTRODUCCIÓN

2.1. Salud Cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se definen como el conjunto de patologías del corazón y los vasos sanguíneos, responsables de la mayor tasa de muerte a nivel mundial. Los datos ofrecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) revelan que en 2008 un 30% de las muertes registradas en el mundo fueron por ECV, y se calcula que en 2030 seguirá siendo la principal causa de fallecimiento. Las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos y son de origen multifactorial, pero hoy se sabe que estas enfermedades pueden prevenirse actuando sobre los principales factores de riesgo (hiperlipemia, hipertensión arterial, tabaquismo, diabetes) así como en factores secundarios (sedentarismo, obesidad, inflamación). Por el contrario, la acción de los factores genéticos (edad, sexo y antecedentes familiares) no está controlada.

Una de las mayores complicaciones en ECV es la arteriosclerosis, un proceso de inflamación crónico basado en el endurecimiento de las arterias y la disfunción endotelial. En condiciones fisiológicas, las células endoteliales sintetizan óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y endotelina 1 en cantidades fisiológicas para la regulación del tono vascular, y mantienen un equilibrio entre los mediadores pro- y anti-inflamatorios para una correcta función endotelial (Dessi y cols., 2013). El NO, generado en las células endoteliales a partir de L-arginina por acción de la enzima endotelial NO sintasa (eNOS), es el principal factor de relajación responsable de la vasodilatación y el mantenimiento del tono vascular, aunque también ejerce otros efectos antiaterogénicos como la reducción en la proliferación del músculo liso vascular, la agregación plaquetaria, la oxidación de lipoproteínas, la expresión de moléculas de adhesión y la adherencia de monocitos y moléculas quimioatrayentes (Andriantsitohaina y cols., 2012) (Figura 1).

La arterioesclerosis es una enfermedad multifactorial. Cuando el proceso arterioesclerótico resulta de la formación de la placa de ateroma, se conoce con el nombre de aterosclerosis. El endotelio que reviste el interior de los vasos sanguíneos actúa como una barrera semi-impermeable entre la sangre y la pared vascular, favoreciendo el flujo normal de lipoproteínas. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son vulnerables a la modificación química y se oxidan fácilmente a lipoproteínas de carácter citotóxico (LDL-ox). Éstas se acumulan junto a los lípidos en el espacio sub-endotelial, iniciando así la formación de la placa de ateroma.

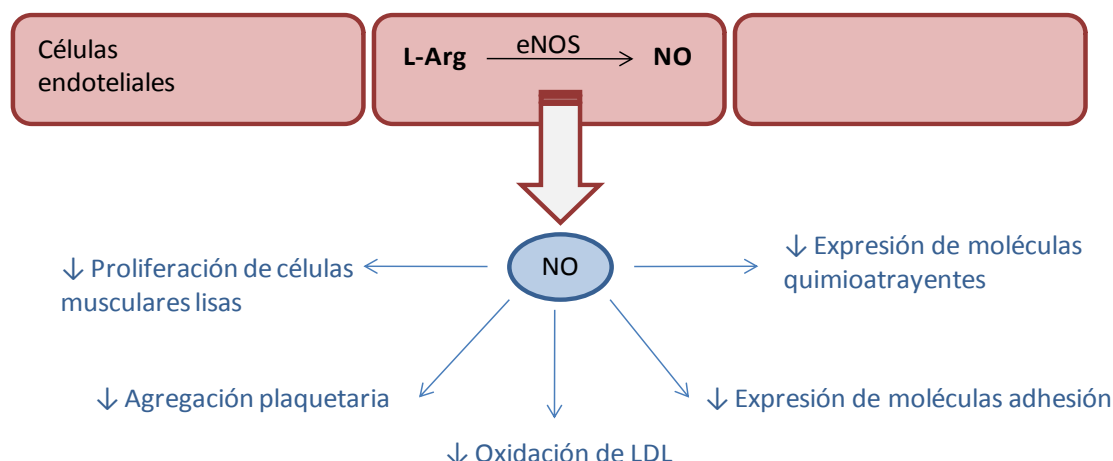


Figura 1. Regulación de la homeostasis vascular dependiente de óxido nítrico (NO). L-Arg: L-Arginina; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial (adaptada de Andriantsitohaina y cols., 2012).

Muchas enfermedades crónicas, incluidas las ECV y la aterosclerosis, tienen un componente inflamatorio implicado en la iniciación, mantenimiento y progresión de la enfermedad (Figura 2). En una primera fase, el tejido dañado favorece la sobreexpresión de moléculas solubles de adhesión celular (vascular, sVCAM-1, e intercelular, iCAM-1) y citoquinas quimiotácticas (interleuquina 8, IL-8, y proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1, MCP-1), que inducen la adhesión y transporte de monocitos al espacio sub-endotelial y su diferenciación en macrófagos. Al mismo tiempo, los macrófagos incorporan las lipoproteínas de muy baja, baja e intermedia densidad (VLDL, LDL e IDL, respectivamente) junto a las LDL-ox formando células espumosas (Glass y Witztum, 2001) y dificultando así el libre flujo de NO. Como consecuencia, se produce una respuesta pro-inflamatoria con la activación de diversas citoquinas, tales como las interleuquinas IL-1 β e IL-6, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o la proteína C reactiva (PCR). Clínicamente, se ha observado un incremento en los niveles de IL-6 y PCR como predictores de muerte cardiovascular (Sattar y cols., 2009), así como de moléculas de adhesión en pacientes con enfermedad coronaria (Koh y cols., 2005). En casos de angina, un rápido diagnóstico puede concluirse por un incremento en los niveles de MCP-1 plasmáticos (Aukrust y cols., 2001). En una segunda fase del proceso inflamatorio, se induce una respuesta anti-inflamatoria con la síntesis de citoquinas inmunosupresoras, tales como la interleuquina IL-10 que inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias. La IL-10 se eleva en respuesta a un alto grado de inflamación, como en el caso de la aterosclerosis.

En estados avanzados, si el recubrimiento fibroso de la placa aterosclerótica se rompe, las fibras de colágeno quedan expuestas, desencadenando la activación y agregación plaquetaria, dando lugar a la formación de trombos. La inflamación regula la fragilidad de esta capa fibrosa. Los linfocitos T entran en la íntima mediante la unión a

moléculas como sVCAM-1 y en respuesta fundamentalmente a interferón gamma (IFN- γ), previamente inducido por diversas quimioquinas.

La relación entre la ECV y otras patologías tales como la diabetes o la obesidad queda patente por la respuesta inflamatoria generada en estos procesos. Algunas hormonas digestivas juegan un papel protector en las etapas tempranas de la ECV, como el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) que reduce la absorción postprandial de lípidos, induce vasodilatación dependiente del endotelio e inhibe la expresión de TNF- α en las células endoteliales (Ansar y cols., 2011). El tejido adiposo, por su parte, secreta también una serie de mediadores inflamatorios tanto con un efecto protector, como la adiponectina, como con efecto pro-inflamatorio, como es el caso de la resistina, responsable en gran medida de la disfunción endotelial por aumentar la permeabilidad de la pared endotelial y promover la formación de células espumosas (Jamaluddin y cols., 2012).

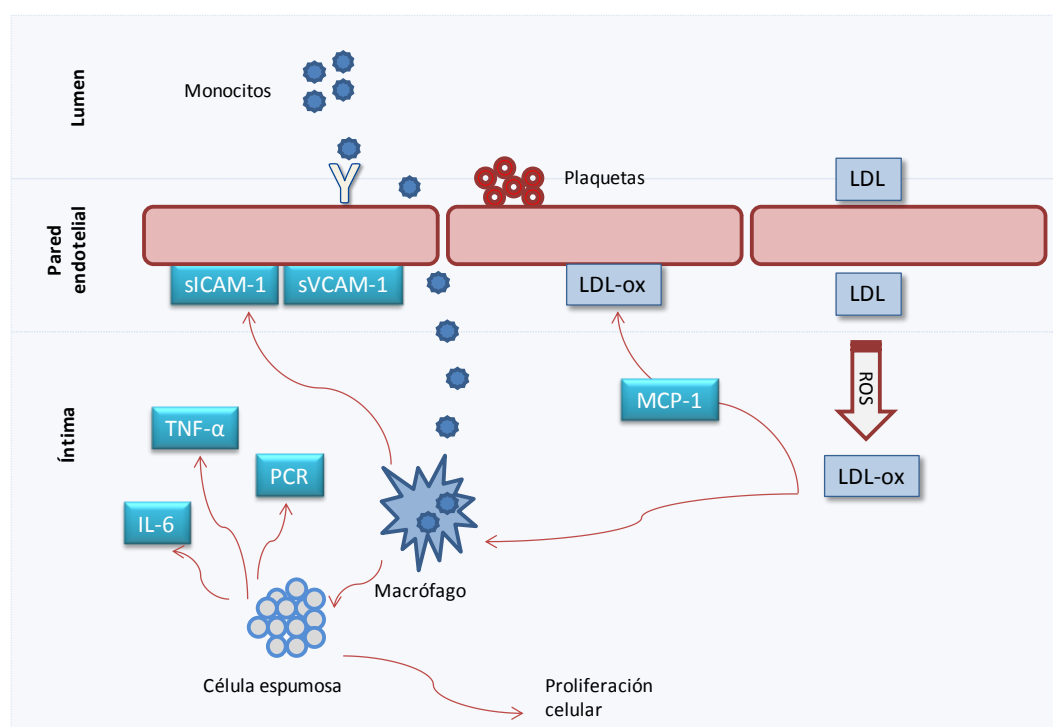


Figura 2. Biomarcadores de inflamación en el proceso aterosclerótico (adaptado de Koenig, 2007). IL: interleuquina; LDL: lipoproteína de baja densidad; LDL-ox: lipoproteína de baja densidad oxidada; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1; PCR: proteína C reactiva; ROS: especies reactivas de oxígeno; sICAM-1: molécula de adhesión intercelular tipo 1 soluble; sVCAM-1: molécula de adhesión vascular tipo 1 soluble; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

Como se ha señalado, la ECV es de origen multifactorial, pudiendo implicar diversos factores tales como el proceso aterosclerótico, la inflamación sub-clínica y la disfunción endotelial o una sinergia de ellos. Dislipemia, hipertensión, diabetes y obesidad son algunos de los factores de riesgo que se resumen a continuación:

2.1.1. Dislipemia

El colesterol (CT), los triglicéridos (TG) y los fosfolípidos son lípidos que se unen a las proteínas para su transporte sanguíneo formando *lipoproteínas*. En torno al 60-70% del colesterol es transportado por lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), un 20-30% por lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y un 10-15% por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-C). Los niveles elevados de CT (> 250 mg/dL), así como de TG (>200 mg/dL), son los responsables de la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, respectivamente, y constituyen un claro marcador de riesgo cardiovascular. Estos procesos van acompañados de niveles elevados de LDL-C (>100 mg/dL) y bajos niveles de HDL-C (< 35 mg/dL).

La dislipemia está íntimamente relacionada con la arterioesclerosis debido a un desequilibrio entre los niveles de lípidos y proteínas proaterogénicas (LDL, TG, VLDL ó IDL) y antiaterogénicas (HDL), y sus principales apolipoproteínas (apoB y apoA-1, respectivamente). Así, estudios epidemiológicos tales como INTERHEART observaron una proporción 5:1 de apoB:apoA-1 en casos de dislipemia, deduciendo que esta relación era uno de los mayores predictores de riesgo de infarto de miocardio (Yusuf y cols., 2004). La interacción iónica de apoB con proteínas implica la acumulación de LDL en la capa íntima de la pared arterial, favoreciendo su mayor predisposición a la oxidación química (LDL-ox) y su consecuente contribución a la formación de la placa de ateroma (Kontush y Chapman, 2006). Además, la ingesta de grasas saturadas y colesterol atenúa los receptores de LDL en el hígado (Woollett y cols., 1992), dificultando así su transporte a los tejidos y favoreciendo su acumulación.

Por otro lado, las HDL son capaces de extraer el CT de las membranas celulares, macrófagos y células espumosas y transportarlo vía interacción con los transportadores de membrana dependientes de ATP (ABCA1 y ABCG1) y con el receptor escavenger tipo BI (SR-BI). Concentraciones séricas de HDL-C por debajo de los valores normales también constituyen un factor de riesgo, tal y como se ha demostrado en los estudios epidemiológicos Framingham, PROCAM (Prospective Cardiovascular Münster) y ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) (Chapman y cols., 2004). Esta lipoproteína de alta densidad no sólo protege contra la acumulación de lípidos, sino que además atenúa el estrés oxidativo, evitando así la oxidación de las LDL y favoreciendo la biodisponibilidad de NO. Por todas estas razones, algunos autores han intentado definir al HDL-C como un

marcador de protección cardiovascular (Gordon y cols., 1977; Briel y cols., 2009), aunque, a pesar de los evidentes beneficios de esta lipoproteína, también se han observado eventos clínicos en individuos con niveles normales de HDL-C. No obstante, no hay duda de que los altos niveles de LDL-C y sus principales apolipoproteínas, y los bajos niveles de HDL-C y apoA-1 son un claro factor de riesgo para la aterogénesis.

Los factores que modifican los niveles de CT pueden ser genéticos, pero el peso corporal, la actividad física, enfermedades como la diabetes, o la ingesta de dietas con alto contenido en grasas también están implicados, por lo que el control sobre los mismos puede ayudar a reducir los niveles de CT.

2.1.2. Hipertensión arterial

La hipertensión, que se define como valores de presión arterial sistólica y diastólica por encima de 140 y 90 mm de Hg, respectivamente, es uno de los mayores factores de riesgo cardiovascular y a su vez es el mejor predictor de ECV. Además, la hipertensión suele coexistir con otras patologías como hipercolesterolemia y obesidad, aumentando así los factores de riesgo para sufrir un evento cardiovascular.

Diversos estudios epidemiológicos han sido llevados a cabo hasta la fecha para evaluar los efectos de la hipertensión en ECV. El estudio epidemiológico Framingham (Gordon y cols., 1977) comparó la mortalidad por eventos cardiovasculares, observando una menor incidencia en pacientes hipertensos tratados farmacológicamente. En el séptimo informe de JNT (Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure) se establecieron las guías para el control de la tensión arterial, dando importancia a la dieta, especialmente al consumo de sal, lo que posteriormente han corroborado diversos autores (Chobanian y cols., 2003; Whelton y cols., 2012). Sin embargo, los factores genéticos podrían ser unos de los principales responsables de la incidencia de hipertensión.

En la hipertensión se produce una activación de angiotensina II cuyo efecto vasoconstrictor estimula la generación de O_2 frente a la síntesis de NO (Taddei y Salvetti, 2002). Además, $TNF-\alpha$ también estimula la producción de factores de vasoconstricción, tales como endotelina-1 y angiotensina. Como consecuencia de la incorrecta dilatación de los vasos, se debilitan las paredes arteriales y se favorece la generación de la placa de ateroma. Este hecho tiene repercusiones clínicas importantes, como la reducción del flujo sanguíneo, que se agrava aún más cuando afecta a arterias pequeñas. La práctica regular y moderada de ejercicio físico es una sencilla forma de controlar la hipertensión, junto con el control de la dieta.

2.1.3. Obesidad

La obesidad, considerada como una epidemia globalizada, es definida como una excesiva acumulación de grasa en el tejido adiposo que altera el estado de salud y está asociada además a otras patologías tales como diabetes tipo 2, hipertensión, fallo cardíaco y algunas formas de cáncer (Lavie y cols., 2009). La clasificación más común, que se basa en el índice de masa corporal (IMC), considera el sobrepeso cuando $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ y la obesidad cuando $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ según la OMS. El principal causante de la obesidad es un desequilibrio entre el consumo de energía y el gasto energético por una alteración en los procesos del hambre o la saciedad, la actividad física, la termogénesis y el gasto metabólico (González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011).

La mayor demanda metabólica en casos de obesidad tiene importantes repercusiones hemodinámicas que íntimamente relacionan la obesidad con la salud cardiovascular, hecho demostrado en diversos estudios epidemiológicos tales como Framingham Heart Study (Hubert y cols., 1983) y Honolulu Heart Study (Donahue y cols., 1987). La obesidad es considerada una expansión del tejido adiposo tanto en el número como en el tamaño de los adipocitos y su distinta distribución en el organismo. A diferencia de la obesidad periférica, la obesidad abdominal o central supone un riesgo de desarrollar aterosclerosis o diabetes mellitus tipo 2. Además, la acumulación de grasa visceral abdominal, fácilmente medida por la circunferencia de la cintura, contribuye al riesgo cardiovascular mediado por obesidad, tal y como se observó en el Nurse's Health Study (Setty y cols., 2007).

La obesidad es la causa más común de la dislipemia. La presencia de ácidos grasos libres en el hígado lleva a una menor lipólisis de TG y, por tanto, a su acumulación hepática, acompañada de una mayor producción de lipoproteínas LDL-C y VLDL-C, que a su vez obstaculizan la hidrólisis de quilomicrones por acción de la enzima lipoprotein lipasa. Además, un intercambio de ésteres de colesterol y TG entre las distintas lipoproteínas induce un descenso en los niveles de HDL-C (Klop y cols., 2013). Por el contrario, la pérdida de peso está asociada a un perfil lipídico más saludable, con menores niveles sanguíneos de TG y LDL-C junto a un aumento de HDL-C (Krauss y cols., 1998). Por otro lado, algunos estudios asocian la hipertensión arterial con hasta un 75-85% de riesgo de padecer obesidad, que a su vez incrementa la resistencia a insulina, así como arritmias y otras complicaciones cardíacas (González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011).

Sin embargo, el tejido adiposo no sólo es un almacén de grasas, sino que también es considerado un órgano endocrino que, en respuesta a un estado inflamatorio, secreta adipoquinas mediadoras entre el tejido adiposo y algunos órganos como el hígado, el páncreas e incluso el sistema nervioso central (SNC) (Cao, 2014). El cerebro también

juega un rol importante en la obesidad regulando la ingesta y el metabolismo energético (González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011). De entre las hormonas implicadas en los procesos neuronales del hambre, la leptina inhibe la sensación de apetito y estimula la termogénesis, mientras que la grelina estimula las neuronas que promueven la secreción de la hormona del crecimiento y estimulan el apetito (Horvath y cols., 2010). Una deficiencia en leptina, sintetizada mayormente por el tejido adiposo y reguladora de la ingesta calórica y el gasto energético, resultaría en un aumento de peso corporal y un mayor riesgo de diabetes tipo 2 (Drel y cols., 2006). La síntesis de estas adipoquinas promueve a su vez la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , MCP-1 y algunas interleuquinas (Gremese y Ferraccioli, 2011), lo que ha generado un debate sobre si la inflamación es la consecuencia o la causa de la disfuncionalidad de los adipocitos. Por el contrario, la adiponectina, sintetizada exclusivamente en el tejido adiposo, alcanza mayor expresión en sujetos delgados que en individuos obesos, ejerciendo un papel beneficioso al suprimir la activación de citoquinas pro-inflamatorias. No obstante, la obesidad ha sido caracterizada como un desorden inflamatorio crónico de bajo grado por su ponderación entre la producción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Siriwardhana y cols., 2013; Figura 3). Mientras TNF- α reduce la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en tejidos periféricos, MCP-1 favorece la infiltración de macrófagos e IL-6 conduce a la producción de PCR hepática, favoreciendo el aumento de peso y del IMC (Pan y cols., 2010).

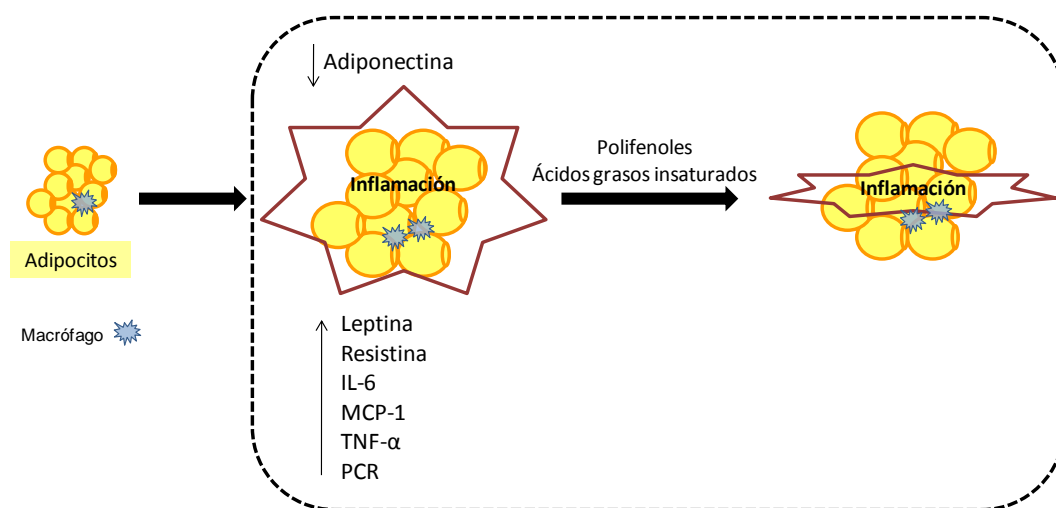


Figura 3. Respuesta inflamatoria asociada a la obesidad (adaptado de Siriwardhana y cols., 2013). PCR: proteína C reactiva. IL: interleuquina; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

Una elevada proporción de ácidos grasos libres circulantes lleva a una disfunción en el mecanismo vasodilatador del NO endotelial (de Kreutzenberg y cols., 2003). Como consecuencia, se activa el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) que regula procesos celulares implicados en inflamación y aumenta la secreción de mediadores vasoconstrictores (endotelina-1) y pro-inflamatorios (MCP-1), así como de moléculas de adhesión (sICAM-1 y sVCAM-1). Estas citoquinas pro-inflamatorias pueden inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) citotóxicas en los monocitos, macrófagos y leucocitos; sin embargo, estos efectos podrían ser contrarrestados con una adecuada proporción de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta (Dessi y cols., 2013) (Figura 4). Además, otros componentes bioactivos de la dieta como los polifenoles también contribuyen a suprimir la inflamación asociada al tejido adiposo y mejorar los desórdenes asociados a la obesidad (Figura 3; Siriwardhana y cols., 2013).

Las estrategias para controlar la obesidad están hoy día centradas en el estilo de vida y en la dieta. Mientras que un estilo de vida sedentario es uno de los cinco mayores factores de riesgo cardiovascular, la práctica regular de ejercicio físico contribuye al control del metabolismo lipídico y promueve la reducción de peso.

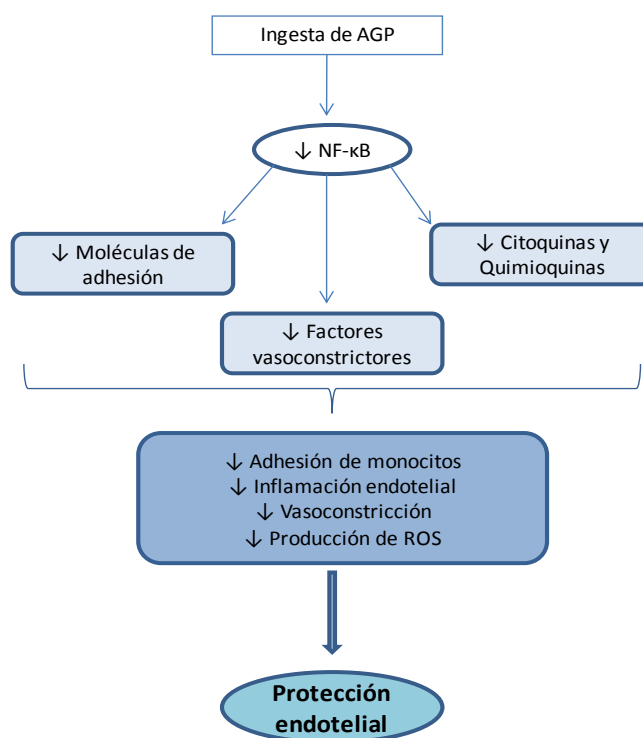


Figura 4. Mecanismos protectores de los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) (adaptada de Dessi y cols., 2013).

2.1.4. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica que se caracteriza por un alto nivel de glucosa en sangre (hiperglucemia). La insulina es la principal hormona responsable del control metabólico de la glucosa, permitiendo su captación y utilización en tejidos periféricos y disminuyendo su síntesis hepática (gluconeogénesis y glucogenolisis). La insulina también regula el metabolismo lipídico disminuyendo la liberación de ácidos grasos a partir de TG en tejidos periféricos, tales como el músculo y el tejido adiposo, y aumentando la síntesis lipídica en hígado y adipocitos, entre otros.

El metabolismo de carbohidratos en el tracto gastrointestinal libera glucosa para su absorción intestinal y su paso a la circulación; sin embargo, el carácter hidrofílico de la glucosa impide su transporte a través de las membranas celulares y requiere la participación de transportadores dependientes de sodio (SGLT) e independientes de sodio (GLUT). La glucosa transportada por SGLT1 entra en las células β pancreáticas vía GLUT2, estimulando la secreción de insulina para la metabolización de glucosa. La estimulación de la absorción de glucosa a través de insulina ocurre a través de una compleja ruta que comienza con el reclutamiento de GLUT4, el único transportador intracelular sensible a insulina. Éste es enlazado a insulina para atravesar la membrana plasmática y activar el transporte de glucosa (Williamson, 2013).

La hiperglucemia puede dar lugar a un efecto glucotóxico irreversible en distintos componentes celulares. Así, en las células β , el metabolismo oxidativo de la glucosa produce ROS, que aumentan la actividad de NF- κ B hasta inducir la apoptosis de la célula β (Stumvoll y cols., 2005).

Los ácidos grasos libres también pueden incrementar la secreción de insulina; sin embargo, una exposición prolongada a los mismos ha sido asociada a resistencia a la insulina, diabetes y disfunción endotelial por activación de NF- κ B (Koh y cols., 2005). Una deficiente sensibilidad a insulina provoca la patología conocida como “resistencia a insulina”, lo que implica la menor capacidad de las hormonas para ejercer sus efectos en los tejidos diana (hígado, músculo y tejido adiposo). De esta forma, se reduce la habilidad de la insulina para estimular la captación de glucosa e inhibir su producción hepática. Los mecanismos responsables de la resistencia a insulina no han sido totalmente clarificados, pero sus consecuencias son bien conocidas, generando una situación de hiperinsulinemia compensatoria que concomitantemente llevaría a la pérdida de capacidad de secreción de insulina por la célula β pancreática y el establecimiento de la diabetes tipo 2. Por otra parte, la insulina, de carácter hipoglucemiante, podría ser inhibida por otras hormonas hiperglucemiantes como el glucagón, de forma que un adecuado equilibrio entre ambas hormonas mantiene los niveles glucídicos en sangre dentro del rango de normalidad.

La adiponectina aumenta la sensibilidad a insulina e inhibe algunos pasos del proceso inflamatorio. A nivel hepático, inhibe la actividad de enzimas gluconeogénicas responsables de la producción endógena de glucosa, mientras que en el músculo favorece el transporte de glucosa (Eckel y cols., 2005). Sin embargo, en pacientes diabéticos los niveles de adiponectina aparecen reducidos, asociando así esta enfermedad a un mayor riesgo cardiovascular. Por su parte, la resistina, que causa resistencia a insulina e intolerancia a glucosa, aparece sobreexpresada en la grasa abdominal, lo que explica el enlace entre obesidad y diabetes (McTernan y cols., 2002). Así, se ha observado que muchos pacientes presentan riesgo de obesidad como consecuencia de la diabetes, incrementando de esta forma la asociación con la ECV. De hecho, según datos proporcionados por la OMS, el 30% de los enfermos cardiovasculares sufre diabetes, siendo uno de los mayores factores de riesgo causantes de muerte.

La dieta y un estilo de vida saludable han sido asociados a un descenso en el desarrollo de ECV, aunque los componentes de la dieta responsables de tales beneficios siguen siendo investigados en la actualidad. La composición en macro y micronutrientes de los alimentos ha sido ampliamente estudiada, siendo evidente su influencia en el estado de salud. Sin embargo, otros componentes minoritarios, considerados no-nutrientes en muchos casos, han mostrado tener propiedades bioactivas ejerciendo un importante papel en la nutrición y en la reducción del riesgo cardiovascular. La fibra dietética y algunos metabolitos secundarios de las plantas, tales como los polifenoles y las metilxantinas, son algunos de los componentes que en la actualidad están entrando a formar parte del concepto de dieta saludable, y que se tratarán en esta Tesis Doctoral.

2.2. Fibra dietética

2.2.1. Definición y aspectos generales

La fibra dietética (FD) fue inicialmente definida como el conjunto de componentes estructurales de las paredes celulares vegetales, incluyendo polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectina) y lignina, resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivos del hombre (Southgate, 1977). Desde entonces, se sigue buscando un concepto universal que englobe al conjunto complejo de sustancias de origen exclusivamente vegetal que resisten a la digestión gastrointestinal y de las propiedades físico-químicas y fisiológicas que engloban a la fibra.

De acuerdo a la evidencia de otros carbohidratos de origen vegetal y polisacáridos sintéticos que también llegan intactos al intestino grueso, años más tarde surgió la definición de Fracción Indigestible (Saura-Calixto y cols., 2000) como aquella fracción de los alimentos vegetales no digerida ni absorbida en el intestino delgado que llega al colon, susceptible de fermentación por la microflora, incluyendo no sólo a polisacáridos y lignina, sino también a otros componentes asociados como polifenoles y almidón, oligosacáridos y proteína resistente. Esta definición, que consideraba a otros componentes de la FD aportando una serie de beneficios fisiológicos, fue igualmente propuesta en 2001 por la American Association of Cereal Chemists (AACC) (De Vries y cols., 2001).

La definición más actual data de 2008 y fue propuesta en la Directiva 90/4896/EEC a partir de la Comisión del Codex Alimentarius (ALINORM 09/32/26). La FD fue entonces definida como el conjunto de polímeros con más de 3 unidades monoméricas de carbohidratos, ya fueran naturales o sintéticos, junto a lignina y otros compuestos asociados que no son digeridos ni absorbidos en el intestino delgado y llegan intactos al colon, donde son fermentados por la microflora intestinal, presentando todos ellos un efecto fisiológico beneficioso para la salud. Esta definición incluía también a otros componentes minoritarios tales como compuestos fenólicos (principalmente, taninos), ceras, saponinas, cutina, fitoesteroles y fitatos entre otros, que generalmente son extractados junto a los carbohidratos, aportando otros beneficios a la fibra. No obstante, cabe mencionar que estos componentes no-carbohidratos no son considerados como fibra cuando están presentes de forma aislada en los alimentos.

2.2.2. Clasificación

La FD se puede clasificar en base a su origen, composición, viscosidad o grado de fermentabilidad, pero el criterio más ampliamente empleado es su hidrosolubilidad, diferenciando entre fibra soluble (FS) e insoluble (FI). La diferente composición de FS y FI es la responsable de las propiedades físico-químicas y los efectos fisiológicos asociados a cada fracción.

➤ Fibra soluble (FS): incluye polisacáridos no almidonados (pectinas, gomas, mucílagos y hemicelulosas ácidas) y otras sustancias análogas (inulina, almidón resistente y otros oligosacáridos) que se encuentran en cereales, legumbres y cítricos, entre otros. La FS se caracteriza por su alta capacidad de retención de agua, originando soluciones viscosas, siendo fermentada por las bacterias de la microflora colónica y generando ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Así, la FS adopta un papel prebiótico, promoviendo la proliferación de bacterias probióticas. Además, la viscosidad asociada a

la FS es responsable de sus acciones sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos y de su potencial anticarcinogénico (Lecumberri y cols., 2007).

➤ Fibra insoluble (FI): se compone de lignina y polisacáridos no almidonados (celulosa y hemicelulosa) y está presente en cereales integrales, frutos secos, verduras y frutas. La FI tiene menor capacidad de retención de agua que la FS, formando soluciones de baja viscosidad que aumentan el volumen de masa fecal y atraviesan inalteradas el tracto gastrointestinal. De esta forma, la FI acelera la velocidad de tránsito y por ello es utilizada para el tratamiento del estreñimiento crónico. A diferencia de la FS, la FI no es fermentada en el colon.

2.2.3. Ingestas y consumo recomendado

La ingesta recomendada de FD en adultos sanos debería ser de 38 y 25 g diarios para hombres y mujeres, respectivamente (Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética, FESNAD) en una proporción 3:1 de FS y FI. Por otro lado, un excesivo consumo de fibra, superior a los 50 g, es contraproducente, ya que podría interferir en la absorción de otros nutrientes y causar un desequilibrio nutricional (Southgate, 1987).

Los datos sobre el consumo de fibra en la población española oscilan entre 16,3 y 18,4 g/día, y se asimilar a los observados en otros países europeos (18,5 g/día) (Tabernero y cols., 2007). A pesar de la variedad de vegetales en la dieta mediterránea, la ingesta de FD está por debajo de las recomendaciones dietéticas, en parte debido al bajo consumo de productos integrales. Por ello es aconsejable incrementar la ingesta de alimentos ricos en fibra, tales como verduras, frutas, cereales integrales, legumbres, etc. Un aporte extra mediante suplementos dietéticos o alimentos fortificados podría ser también una buena estrategia para lograr la ingesta necesaria de FD.

Atendiendo a los componentes de la fibra dietética total, a continuación se muestra un resumen de alimentos ricos en fibra y su composición en las fracciones soluble e insoluble (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de fibra dietética total, fibra soluble y fibra insoluble de algunos alimentos de la dieta en g/100 g de alimento.

	Fibra Total	Fibra Soluble	Fibra Insoluble
Arroz integral	3,33	0,44	2,89
Pan integral	6,71	1,51	5,21
Pasas	8,13	4,50	3,63
Judías	5,40	1,38	4,02
Guisantes	6,19	0,41	5,79
Brócoli	4,66	1,85	2,81
Peras	3,17	0,92	2,25
Kiwi	3,39	2,61	0,80

(Adaptado de Li y cols., 2002)

2.2.4. Propiedades fisiológicas

La FD ejerce diversas acciones fisiológicas a lo largo del tracto gastrointestinal debido a sus conocidas propiedades físico-químicas: retención de agua, fermentación colónica, intercambio catiónico y adsorción y fijación de sales biliares y colesterol. En el estómago, la FD aumenta la viscosidad y retrasa el vaciamiento gástrico, generando sensación de saciedad. Este efecto saciante, unido al bajo contenido calórico de la FD, induce un descenso en la ingesta energética.

La FS, por su elevada capacidad de retención de agua, tiende a formar coloides tipo gel donde capta sustancias orgánicas como el colesterol y las sales biliares en el intestino delgado. Además, debido a la formación de estos geles, se ralentiza la acción de la α -amilasa pancreática y otros enzimas digestivos (pepsina y amiloglucosidasas), disminuyendo la hidrólisis de carbohidratos y proteínas. Todos estos factores, principalmente asociados a la capacidad de retención de agua de la FS, contribuyen a una ralentización en el vaciado gástrico, a una menor absorción de nutrientes y a la mencionada mayor sensación de saciedad.

Los polisacáridos constituyentes de la FS son altamente fermentados en el intestino grueso por la microflora colónica, frente a la limitada fermentabilidad de la FI. Como productos de la fermentación colónica se generan AGCC (principalmente, acético, propiónico y butírico) y gases. Acetato y propionato son empleados por el organismo como sustratos para la lipogénesis y gluconeogenesis, respectivamente, mientras que el

butirato ejerce un papel fundamental en el mantenimiento de la salud del colonocito (McIntyre y cols., 1993).

Por otro lado, la capacidad de adsorción de algunos nutrientes por parte de la FD podría provocar un desequilibrio nutricional. Algunos minerales como calcio, hierro, cinc y cobre pueden ser retenidos y posteriormente liberados intactos en el colon. Los AGCC allí generados facilitan la absorción y biodisponibilidad de los minerales (Torre y cols., 1991).

Cabe mencionar que la presencia de otros componentes minoritarios podría contribuir a los efectos fisiológicos asociados a la FD. Aproximadamente, un 50% de los polifenoles de la dieta, principalmente taninos y feruloatos, se encuentran asociados a la FD, aportando propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias que contribuirán a sus beneficios en salud cardiovascular y otros desórdenes metabólicos (Bravo, 1998). Las propiedades fisiológicas de los compuestos polifenólicos serán más extensamente detalladas en el apartado 4.

2.2.5. Efectos en salud

La FD comienza a ser considerada un nutriente pues sus positivos efectos fisiológicos sobre saciedad, regulación del tránsito intestinal, glicemia y lipemia la convierten en esencial para contribuir a un buen estado de salud. Así, el consumo de FD se ha sido asociado a una menor incidencia de padecer trastornos gastrointestinales, obesidad, diabetes, ECV y cáncer (Anderson y cols., 2009). Además, la asociación de la FD a otros compuestos bioactivos, tales como polifenoles, carotenoides, fitoesteroles o subproductos de la reacción de Maillard, promueve e incrementa los efectos saludables de la fibra, aportando además efectos antioxidantes, anti-inflamatorios, hipocolesterolemiantes o hipoglicemiantes.

Las propiedades beneficiosas asociadas al consumo de FD contribuyen a reducir el riesgo de padecer diversas patologías que a continuación se detallan.

2.2.5.1. Enfermedades cardiovasculares

Los estudios epidemiológicos sobre el efecto de la FD en salud cardiovascular han sido extensos hasta la fecha. Estos efectos dependen de la capacidad de adsorción de las grasas, incluido el colesterol, en el tracto digestivo por parte de la fibra y la disminución de su absorción intestinal. Durante los procesos fermentativos disminuye el pH fisiológico y se dificulta la solubilidad y reabsorción de las sales biliares. Como consecuencia, se promueve su síntesis *de novo* a partir de las reservas de colesterol,

disminuyendo los niveles séricos de este lípido. Así mismo, se ha sugerido que el efecto hipolipidémico podría ser debido a los AGCC generados como consecuencia de la fermentación de la fibra, dado que el propionato es capaz de inhibir la síntesis de lípidos y ácidos grasos (Tungland y Meyer, 2002). En 1999, Brown y colaboradores confirmaban que el consumo de FS reducía los niveles séricos de CT y LDL-C, y tras la ingesta de 10 g/día de FD, especialmente FS, otros autores confirmaron un descenso del 30% en el riesgo de enfermedad coronaria (Pereira y cols., 2004).

A día de hoy, la influencia de la FI sigue siendo investigada; sin embargo, sus demostrados efectos hipotrigliceridemiante e hipocolesterolemizante (Lecumberri y cols., 2007) podrían deberse a su composición en otras sustancias minoritarias, tales como polifenoles y fitoesteroles. Así, tras la ingesta de productos de fibra enriquecidos en polifenoles, su efecto hipolipemiante ha sido asociado a la sinergia de ambos componentes bioactivos sumando propiedades antioxidantes a la FD (Saura-Calixto, 1998; Ruiz-Roso y cols., 2010).

Aunque los mecanismos anti-inflamatorios de la FD aún no han sido bien clarificados, los menores niveles circulantes de IL-6 y PCR podrían estar asociados al efecto hipoglicémico e hipolipemiante de la FD (Ma y cols., 2006; 2008).

2.2.5.2. Enfermedades gastrointestinales

El principal efecto beneficioso asociado a la fibra se produce a nivel gastrointestinal, reduciendo el estreñimiento y el riesgo de padecer desórdenes como diverticulosis o síndrome de colon irritable, entre otros (Aldoori y cols., 1998; Tarpila y cols., 2005).

El conocido efecto de la FS y FI sobre la absorción de agua contribuye a un aumento de la masa fecal así como la mayor presencia de componentes de los alimentos no digeridos y/o absorbidos por la acción de la FD, lo que favorece el tránsito intestinal, reduciendo así el estreñimiento. La adsorción de sales biliares también estimula la motilidad y reduce el tiempo de tránsito intestinal, al igual que los gases generados durante la fermentación colónica de la fibra, que facilitan la propulsión. El consumo de FD también contribuye a una mayor consistencia en las deposiciones, mejorando las excreciones en casos de diarrea. Por otro lado, una escasa proporción de bacterias colónicas, como *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*, suelen asociarse a un mayor recuento de bacterias como *Enterococos*, *Clostridium*, etc., lo que podría producir infecciones que causarían diarrea (Nakao y cols., 2002). Sin embargo, las características prebióticas de la FS contribuyen al mantenimiento de una flora intestinal saludable con mayor proporción de bacterias probióticas.

Otras enfermedades gastrointestinales han mostrado una relación directa con el consumo de FD. Así, la colitis ulcerosa, una enfermedad inflamatoria del intestino, se debería a un defecto en la oxidación de los AGCC, principalmente butirato (McIntyre y cols., 1993). De forma similar, una dieta con una ingesta apropiada de FD, preferiblemente FI, ayuda a disminuir la presión intraluminal del colon, reduciendo así el riesgo de padecer diverticulitis, tal y como demostraron Aldoori y colaboradores (1998).

Cabe mencionar que como consecuencia de la fermentabilidad de la FD, se han descrito algunos efectos adversos, tales como la obstrucción intestinal, flatulencia, diarrea o dolor abdominal, generalmente asociados a un consumo excesivo de FD (> 50 g/día) o a un escaso aporte hídrico (Southgate, 1987; Aldoori y cols., 1998).

2.2.5.3. Obesidad

Las estrategias para reducir la obesidad y el sobrepeso, dos de las principales epidemias a nivel mundial, incluyen el incremento de la actividad física junto a una dieta saludable y baja en grasas saturadas. La FD se ha usado como co-ayudante en casos de obesidad gracias a su efecto saciante, observando una reducción de peso tras el consumo de alimentos no refinados frente a alimentos refinados (Liu y cols., 2003). La elevada capacidad de absorción de agua de la FS implica un retardo en el vaciado gástrico; como consecuencia, se prolonga la sensación de saciedad y se acelera la oxidación y lipólisis de las grasas (Jenkins y cols., 1986). La fibra es también capaz de fijar ciertas sustancias y nutrientes, entre ellos la grasa, disminuyendo su absorción y favoreciendo su excreción (Dikeman y Fahey, 2006).

Por otro lado, la obesidad y la inactividad física podrían causar resistencia a insulina e hiperinsulinemia. Sin embargo, la más lenta absorción de carbohidratos, incluida la glucosa, asociada a la FD disminuiría los niveles postprandiales de glucosa, que a su vez contribuye a una mayor sensibilidad a insulina (Ludwig y cols., 1999).

2.2.5.4. Diabetes mellitus tipo 2

Una dieta rica en FD contribuye además al control de la glicemia, y, por consiguiente, a un menor riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2.

En 1979, Jenkins estudió distintos tipos de fibras (gomas y mucílagos) y observó una mejoría en el control metabólico de la diabetes. La influencia de la FS en el vaciamiento gástrico, su acción indirecta disminuyendo la actividad de enzimas digestivas con la consiguiente menor liberación de glucosa, así como su menor absorción intestinal y, por

tanto, su menor transporte al torrente sanguíneo, son algunos de los mecanismos de acción de la FD (Frost y cols., 2003; McKeown y cols., 2002). Por otro lado, los AGCC generados durante la fermentación colónica de la FS parecen inhibir la gluconeogénesis hepática y reducir la resistencia a insulina (Anderson y cols., 1984; 2009).

Tal y como se ha demostrado en estudios clínicos en humanos, la ingesta de FD, preferentemente FS, mejora el control glicémico y decrece el riesgo de hiperinsulinemia observado en pacientes con diabetes tipo 2 (Chandalia y cols., 2000). Atendiendo a estas premisas, los individuos diabéticos deberían incluir en su dieta un alto consumo de alimentos con un contenido natural en fibra y alimentos mínimamente refinados (Salmerón y cols., 1997; Giacco y cols., 2000).

2.2.5.5. Cáncer de colon

Una de las principales causas asociadas a la mayor incidencia de trastornos colónicos, incluido el cáncer colorrectal, se debe al menor consumo de cereales integrales a expensas de un elevado consumo de cereales refinados, sin descartar el papel perjudicial de las carnes rojas, grasas saturadas y alcohol (Burkitt, 1971). Estudios epidemiológicos, tales como el Nurse's Health o el European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), han mostrado el papel de la FD en la protección frente al cáncer colorrectal (Bingham y cols., 2003).

El efecto protector de la FD frente al cáncer de colon podría deberse a la suma de diversos mecanismos en el tracto gastrointestinal. Por un lado, la adsorción de sales biliares impide que sean transformadas por las bacterias intestinales para convertirlos en ácidos biliares secundarios, caracterizados como agentes pro-carcinogénicos. Además, la producción de AGCC durante la fermentación de la FS altera el pH del colon, inhibiendo la acción de la enzima 7- α -hidroxilasa, que contribuye a la menor formación de ácidos biliares secundarios. Por otra parte, la reducción en el tiempo de tránsito intestinal por parte de la FD y la dilución de contenidos intestinales por la presencia de fibra, agua y componentes de los alimentos no digeridos supone un menor contacto de los mutágenos y carcinógenos de origen alimentario con el intestino y, por tanto, un menor riesgo de generar neoplasias intestinales (Banqué y cols., 2012).

Así mismo, el butirato producido durante la fermentación colónica de la FS ejerce un papel fundamental sobre el colonocito, regulando la expresión de genes implicados en la proliferación celular y apoptosis, contribuyendo así de manera significativa al efecto anticancerígeno de la FD a nivel colónico (McIntyre y cols., 1993).

2.3. Polifenoles

2.3.1. Definición y aspectos generales

Los polifenoles son un grupo de metabolitos secundarios ampliamente encontrados en todos los órganos de las plantas. Debido a su abundante presencia en el reino vegetal, los polifenoles son una parte importante de la dieta, siendo especialmente abundantes en frutas y verduras, aceite de oliva, cacao y bebidas como el té, vino o café (Manach y cols., 2004). Estos compuestos, que suelen estar en mayor concentración en la piel y la cáscara, son en gran parte responsables de las características organolépticas de los alimentos que los contienen (D'Archivio y cols., 2010). Además, se caracterizan por su acción protectora frente a situaciones de estrés (plagas, herbívoros, luz ultravioleta), haciendo a la planta más resistente (Bravo, 1998).

La investigación abarca desde el conocimiento de los distintos grupos de polifenoles existentes y su presencia en las plantas, hasta otros campos del metabolismo humano como su consumo, biodisponibilidad y efectos fisiológicos. A continuación se van a abordar cada uno de los distintos aspectos que hasta la fecha se conocen sobre los polifenoles.

2.3.2. Clasificación

Los polifenoles se caracterizan por una estructura básica de fenol. Se conocen más de 8000 compuestos diferentes, que abarcan desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados, generalmente conjugados con azúcares (glicósidos) u otros compuestos orgánicos (Bravo, 1998; Tsao, 2010).

La clasificación de los polifenoles podría hacerse en base a su origen, su actividad biológica, su peso molecular o su estructura química. Atendiendo a sus características estructurales, los polifenoles de la dieta se pueden agrupar en fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos (Bravo, 1998; Scalbert y Williamson, 2000).

2.3.2.1. Fenoles simples

La estructura fenólica más sencilla consta de un anillo aromático (C_6) como principal unidad estructural del fenol, crisol, timol y resorcinol, entre otros.

2.3.2.2. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se caracterizan estructuralmente por un anillo fenol (C_6) con un sustituyente carboxílico, dando lugar a ácidos hidroxibenzoicos (C_6-C_1), ácidos fenilacéticos (C_6-C_2) o ácidos fenilpropiónicos (C_6-C_3) (Figura 5).

Los principales ácidos hidroxibenzoicos son los ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico o protocatéquico. A diferencia de los ácidos fenilacéticos, que han sido poco descritos, los ácidos fenilpropiónicos son un importante grupo de fenoles de bajo peso molecular, entre los que destacan los ácidos hidroxicinámicos (ácido cumárico, cafeico, CA, y ferúlico, FA). Estos últimos suelen encontrarse como derivados glicosilados, pero también esterificados con ácido quínico, siquímico o tartárico. La conjugación de ácidos hidroxicinámicos con ácido quínico (QA) da lugar a diversos derivados cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA y 5-CQA), feruloilquínicos (3-FQA, 4-FQA y 5-FQA), dicafeoilquínicos (3,4-diCQA, 3,5-diCQA y 4,5-diCQA), diferuloilquínicos (3,4-diFQA, 3,5-diFQA y 4,5-diFQA), *p*-cumaroilquínicos, etc., siendo el ácido 5-*O*-cafeoilquínico, comúnmente conocido *ácido clorogénico*, el principal polifenol del café.

La condensación de varias unidades de ácidos fenólicos, principalmente de ácido gálico, resulta en compuestos de elevado peso molecular conocidos como taninos hidrolizables, que a su vez pueden dividirse en galotaninos y elagitaninos dependiendo de la naturaleza del anillo benzoico. Estos compuestos, aunque no son muy abundantes, son los principales componentes fenólicos en frutos del bosque o granada (Clifford, 2000).

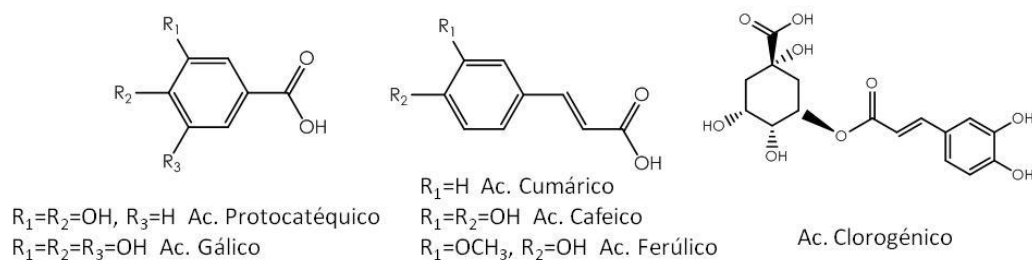


Figura 5. Estructuras de algunos ácidos fenólicos.

2.3.2.3. Flavonoides

Son el grupo más común y numeroso, con más de 5000 compuestos. Los flavonoides se caracterizan por una estructura de difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$), consistente en dos anillos aromáticos enlazados por un heterociclo oxigenado de 3 átomos de carbono (anillo pirano). Los flavonoides se encuentran mayoritariamente en su forma glicosilada (*O*-glucósidos y *C*-glucósidos), aunque también pueden ocurrir en las plantas en forma libre (agliconas) o conjugada (esterificados, sulfatados, etc.).

En función del estado de oxidación del heterociclo pirano y del número y posición de los sustituyentes hidroxilo, los flavonoides pueden clasificarse en 6 subgrupos (Manach y cols., 2004) que se describen a continuación. La Figura 6 muestra algunos de los flavonoides más comunes de cada subgrupo:

- Flavonoles: esta subfamilia de polifenoles, generalmente presentes como glucósidos, es la más ubicua, con quercetina como su componente más representativo. La cebolla es la principal fuente de flavonoles, aunque también pueden encontrarse en otros vegetales y en bebidas como té y vino.
- Flavonas: este grupo de flavonoides menos común ha sido únicamente identificado en perejil y apio, así como en la pimienta y en la piel de algunos frutos. Las principales flavonas son los glicósidos de luteolina en el pimiento y apigenina en el apio.
- Flavanonas: son principalmente encontradas en cítricos, tomates y plantas aromáticas (menta). Las flavanonas más importantes son naringenina y hesperetina, aunque frecuentemente se encuentran glicosiladas como naringina y hesperidina,

respectivamente. Generalmente se localizan en las partes sólidas, por lo que la concentración en zumo puede llegar a ser hasta 5 veces menor que en el fruto.

➤ **Antocianidinas:** son los principales componentes de los pigmentos que dan color a los pétalos de las flores, frutos y vegetales (Mazza y Miniati, 1993), siendo el color proporcional al contenido de antocianidinas. La cianidina es la aglicona más importante, aunque las antocianidinas suelen estar glicosídadas formando los antocianos o antocianinas, responsables del color del vino tinto, uva, fresas y otras bayas.

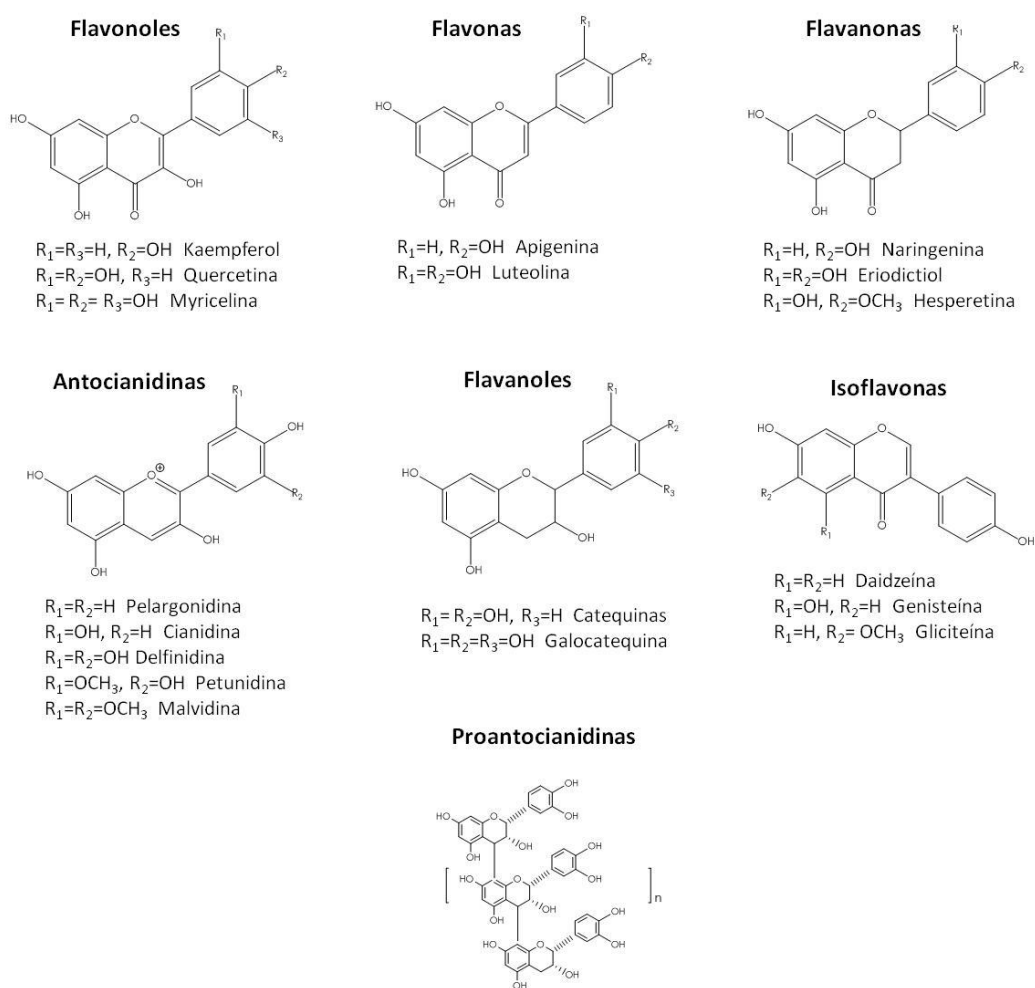


Figura 6. Estructuras de algunos polifenoles flavonoides.

➤ **Flavanoles:** son los únicos flavonoides que no aparecen glicosilados en los alimentos; sin embargo, suelen encontrarse esterificados, principalmente con ácido gálico. En la naturaleza pueden encontrarse en forma de monómeros (catequinas), oligómeros (procianidinas) o polímeros (proantocianidinas o taninos condensados).

Las principales fuentes de catequinas son té y cacao, aunque los flavanoles también están presentes en muchas frutas, principalmente en la piel. Los flavan-3-oles (catequina, epicatequina, galocatequina, galocatequin galato, epigalocatequina y epigalocatequin galato) son los monómeros encontrados en fruta y té, mientras que los flavan-3,4-dioles predominan en leguminosas, uva y vino (Arts y cols., 2000).

La di-, oligo- o polimerización de flavanoles da lugar a los taninos condensados o *proantocianidinas*, considerados fenoles complejos. Estos compuestos, que aumentan su insolubilidad con el grado de polimerización, son los responsables del carácter astringente de ciertas frutas (uva, melocotón, manzana) y bebidas (vino, té, cerveza), así como del amargor del chocolate (Scalbert y cols., 2005).

➤ **Isoflavonas:** este grupo polifenólico, mayoritariamente encontrado en plantas leguminosas (soja), está principalmente representado por genisteína y daidzeína, que habitualmente se encuentran glicosiladas (genistina y daidzina, respectivamente).

2.3.2.4. Alcoholes fenólicos

Los alcoholes fenólicos presentan una estructura C_6-C_2 . Estos compuestos son de elevada importancia en el aceite de oliva virgen, donde se encuentran el tirosol y el hidroxitirosol (Figura 7) como los principales compuestos fenólicos.

2.3.2.5. Estilbenos

Estos compuestos fenólicos de estructura $C_6-C_2-C_6$ están presentes en un número limitado de fuentes (uva y vino, principalmente). Sin embargo, algunos estilbenos como el resveratrol (Figura 7) del vino adquieren gran importancia por su papel anticancerígeno.

2.3.2.6. Lignan

Los lignanos responden a la estructura $C_6-C_3-C_3-C_6$. Aunque se han encontrado en alimentos como los cereales, la linaza es la fuente más rica de estos compuestos fenólicos. El principal lignano de la linaza es el enterodiol (Figura 7).

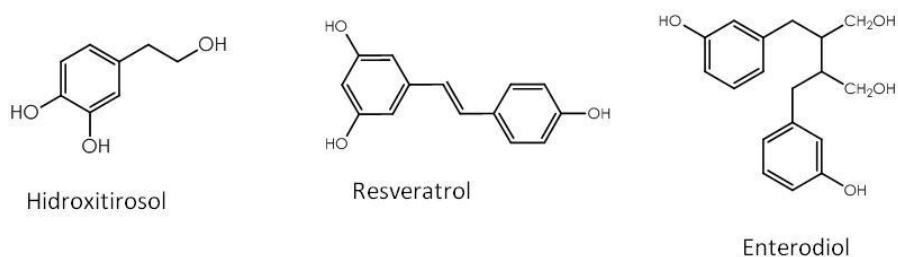


Figura 7. Estructuras de algunos alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos.

2.3.2.7. Polifenoles asociados a la fibra dietética

Algunos compuestos fenólicos se encuentran asociados a otros componentes de la matriz alimentaria como la fibra dietética (FD) (Bravo, 1998). Se trata, principalmente, de compuestos de alto peso molecular, tales como los taninos hidrolizables y condensados, aunque polifenoles de bajo peso molecular, como el ácido ferúlico, se encuentran frecuentemente asociados a los polisacáridos de la pared celular de las plantas. Estos feruloatos, al igual que los taninos, se comportarían como la FD, no siendo hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre, llegando intactos al intestino grueso. Algunos compuestos polifenólicos como los taninos hidrolizables derivados del ácido elágico (elagitaninos) pueden ser fermentados por la flora colónica, formando metabolitos como las urolitionas A y B, biodisponibles y con importantes propiedades anticancerígenas (Giménez-Bastida y cols., 2012).

2.3.3. Los polifenoles en la dieta y su ingesta

La cuantificación de los polifenoles de la dieta es realmente compleja debido a la variabilidad de compuestos, así como a la influencia de factores genéticos, ambientales e incluso debido a la propia especie vegetal. Por otro lado, las condiciones de conservación y preparación del alimento también influyen en la composición fenólica de los alimentos que ingerimos, llegando a reducir la concentración de polifenoles en porcentajes muy significativos durante el procesado industrial y culinario del alimento (Van der Sluis y cols., 2001). La Tabla 2 resume el contenido de polifenoles totales de algunos alimentos y bebidas (Bravo, 1998).

Tabla 2. Polifenoles totales encontrados en diferentes alimentos y bebidas.

Alimentos		Bebidas	
Cebada (mg/100 g p.s.)	1200-1500	Té (mg/200 mL)	150-210
Maíz (mg/100 g p.s.)	30,9	Café (mg/150 mL)	200-550
Arroz (mg/100 g p.s.)	8,6	Vino tinto (mg/L)	1000-4000
Guisantes (mg/100 g p.s.)	380-1710	Vino blanco (mg/L)	200-300
Perejil (mg/100 g p.f.)	55-180	Cacao (g/100 g p.s.)	12-18
Grosella negra (mg/100 g p.f.)	140-1200		
Uva (mg/100 g p.f.)	50-490		
Fresa (mg/100 g p.f.)	38-218		

(Adaptado de Bravo, 1998). p.s.: peso seco; p.f.: peso fresco.

Estimar la composición de polifenoles presentes en los alimentos es primordial para determinar el consumo medio de estos compuestos en la dieta. Algunos autores han cuantificado una ingesta diaria de 820 ± 323 mg de polifenoles totales procedentes de frutas, verduras y bebidas en una población adulta española (Tresserra-Rimbau y cols., 2013). La Tabla 3 resume algunos de los polifenoles ingeridos en dicho estudio y la fuente mayoritaria de procedencia.

Tabla 3. Fuentes alimentarias y cantidad de polifenoles totales mayoritariamente ingeridos por la población española.

Tipo de polifenoles	Polifenoles totales (mg/día)	Fuentes alimentarias
Ácidos hidroxicinámicos	276 ± 146	Café
Flavanonas	132 ± 125	Naranjas
Proantocianidinas	117 ± 81	Vino tinto, manzanas
Flavonoles	80,4 ± 32,7	Espinacas, judías
Flavonas	41,6 ± 26,1	Naranjas
Antocianos	38,5 ± 37,4	Cerezas, vino tinto
Catequinas	26,7 ± 19,6	Manzanas, vino tinto

Los resultados representan la media ± SD (adaptado de Tresserra-Rimbau y cols., 2013).

Sin embargo, los datos de ingesta podrían estar subestimados ya que la cuantificación de polifenoles ingeridos en los alimentos no considera aquellos compuestos fenólicos asociados a otros componentes alimentarios como la FD ni los compuestos fenólicos de alto peso molecular no extraídos con los métodos tradicionales y, por tanto, no cuantificados (Bravo y cols., 1994).

Atendiendo a los diversos efectos saludables asociados a los polifenoles, cabría esperar una elevada recomendación de ingesta de los mismos. Sin embargo, y de acuerdo con Holst y Williamson (2008), el efecto dosis-respuesta de los fitoquímicos no es lineal, y una ingesta excesiva podría llevar a efectos adversos. No obstante, la biodisponibilidad de estos compuestos es, en general, limitada, como se apunta en el siguiente apartado.

2.3.4. Biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles de la dieta

Desde un punto de vista nutricional, la biodisponibilidad de un componente de los alimentos podría ser definida como la fracción del mismo que alcanza la circulación sistémica y el sitio específico donde puede ejercer su acción biológica (Porrini y Riso, 2008). Por ello, el estudio de la distribución de los nutrientes en la dieta y su biodisponibilidad en el organismo es primordial para poder establecer su actividad biológica y evaluar la concentración a la cual pueden ejercer sus efectos beneficiosos.

La absorción de los polifenoles parece estar más relacionada con la estructura química del compuesto que con la concentración ingerida (Scalbert y Williamson, 2000); sin embargo, otros factores de índole genético, ambiental o culinario podrían afectar a

su biodisponibilidad. Además, los polifenoles más abundantes no son siempre los más activos biológicamente, bien porque tienen una baja actividad intrínseca, o bien porque son pobremente absorbidos, altamente metabolizados o rápidamente excretados (Manach y cols., 2004). La Figura 8 resume la absorción y metabolización de los compuestos fenólicos.

La mayoría de los polifenoles presentes en los alimentos se encuentran principalmente acilados, esterificados, glicosilados o incluso polimerizados en su forma nativa, y necesitan ser hidrolizados a su forma aglicona para su posterior absorción. Mayoritariamente, los polifenoles no sufren modificación a nivel oral, si bien los glucósidos de flavonoides, aunque no otros glicósidos, pueden ser hidrolizados a sus correspondientes agliconas por acción de β -glucosidasas salivares (Walle y cols., 2005). Igualmente, una esterasa presente en la saliva es capaz de hidrolizar polifenoles acilados como epigallocatequin galato a epicatequin galato (Yang y cols., 1999). En humanos, la mayor parte de los polifenoles son además estables a los ácidos estomacales (Gee y cols., 1998), de forma que no se produce la absorción de glicósidos o de polímeros, ni la hidrólisis de los mismos, llegando al intestino en su forma nativa conjugada. Únicamente, las agliconas de algunos flavonoides, como quercetina y daidzeina, y algunos ácidos fenólicos en su forma libre, como el cinámico y el ferúlico, pueden ser absorbidos en el estómago de animales (Manach y cols., 2004; 2005). El ácido cafeico también sufre absorción pasiva en el estómago gracias a su forma no ionizada a diferencia de sus análogos esterificados, como es el caso del ácido clorogénico, que en animales atraviesan el estómago intactos (Olthof y cols., 2001).

En el intestino delgado, el transportador dependiente de glucosa (SGLT1) facilita la absorción de polifenoles glicosilados al interior del enterocito (Hollman y cols., 1995), aunque algunos autores han descrito la implicación de otros transportadores de membrana, tales como GLUT o las proteínas asociadas a la resistencia de múltiples drogas (MRP), que favorecen la salida del enterocito de algunos glicósidos catiónicos y de epicatequin galato (Walle, 2004). En el enterocito, los compuestos pueden ser hidrolizados a sus correspondientes agliconas gracias a enzimas con una elevada especificidad por residuos β -glucosa, tales como la β -glucosidasa citosólica (CBG) y la lactasa-floridin hidrolasa (LPH) (Scalbert y Williamson, 2000).

A diferencia de la mayoría de los glicósidos, y con excepción de epigallocatequin galato que sufre degalactilación a nivel oral, la acilación con ácido gálico no parece influir tanto en la biodisponibilidad de los polifenoles. Éstos pueden atravesar las paredes del intestino sin hidrólisis o desconjugación previa (Yang y cols., 1999) gracias a los transportadores de monocarboxilato (MCT) implicados en la difusión de la mayoría de polifenoles acilados y esterificados, así como en el transporte de los mismos a los tejidos diana (Lafay y Gil-Izquierdo, 2008). No obstante, atendiendo a la afinidad de los

sustratos por el transportador MCT, la absorción de los fenoles acilados en el tracto gastrointestinal ha mostrado una gran variabilidad (Konishi y cols., 2006).

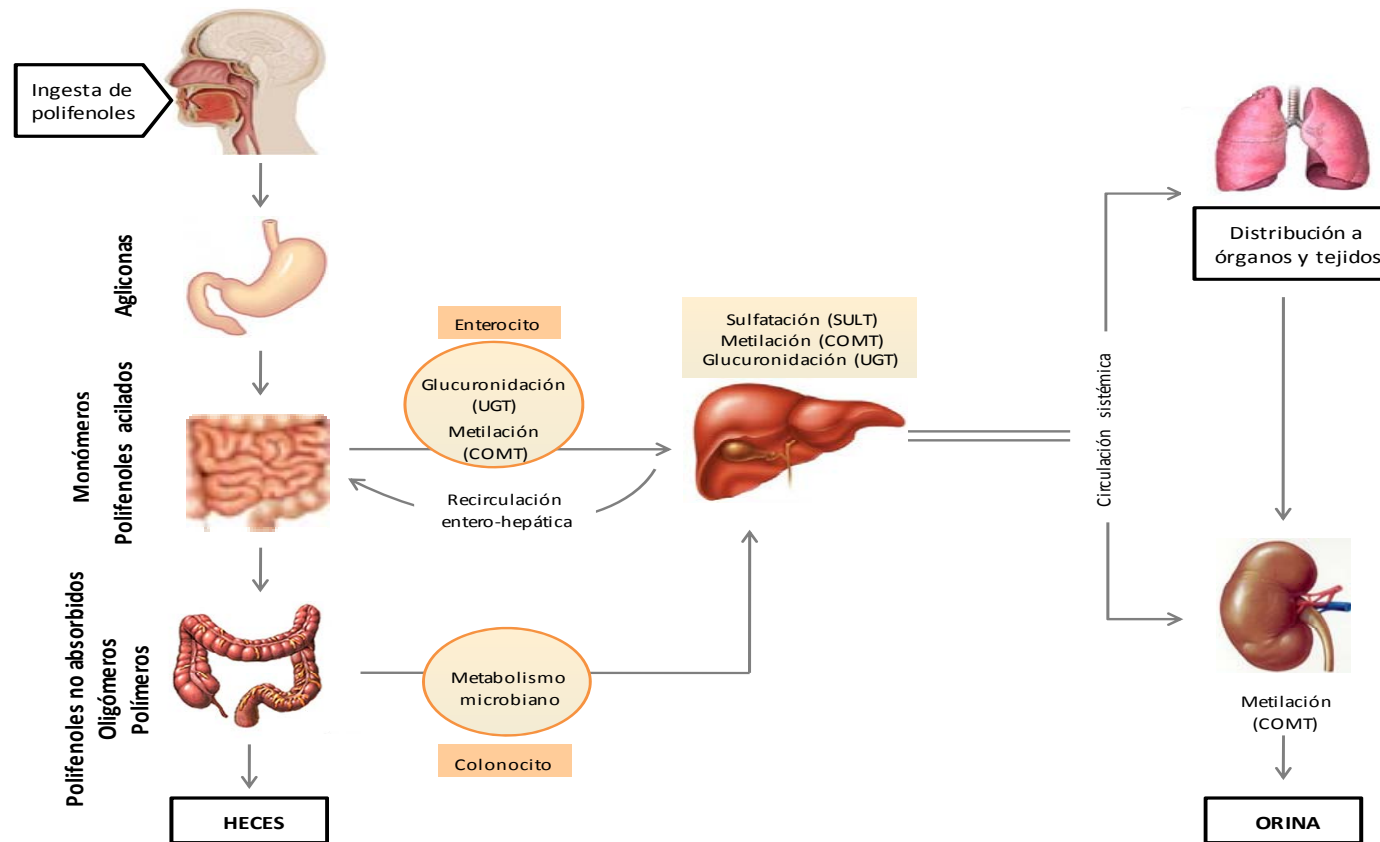


Figura 8. Absorción y metabolización de polifenoles en el organismo humano (adaptado de Urpi-Sarda y cols., 2011). SULT= sulfotransferasas; UGT= UDP-glucuronosil transferasas; COMT= catecol-O-metil transferasa.

La presencia de esterasas en el intestino delgado, tanto luminales como en células de la mucosa intestinal (Andreasen y cols., 2001) permite la desconjugación de los compuestos esterificados, por lo que algunos derivados hidroxicinámicos, como el ácido clorogénico o el ácido ferúlico asociado a FD (Kern y cols., 2003) pueden ser liberados para su posterior absorción intestinal. Así mismo, las esterasas bacterianas presentes en la microflora colónica permiten la liberación de ácidos ferúlico, sinápico o *p*-coumárico asociados a las paredes celulares de cereales (Andreasen y cols., 2001). En humanos, la enzima α -ramnosidasas únicamente están presentes en la microflora colónica, por lo que algunos ramnoglucósidos como la rutina son hidrolizados en el colon (Day y cols., 1998). La metabolización de los polifenoles también depende del peso molecular, de forma que las procianidinas son pobremente absorbidas en el intestino y por ello no han sido detectadas en fluidos biológicos en sus formas conjugadas; sin embargo, los enzimas microbianos colónicos favorecen la despolimerización de las procianidinas a sus correspondientes monómeros (Appeldoorn y cols., 2009). Por otra parte, las esterasas presentes en la microflora colónica hidrolizan los flavonoides esterificados a ácidos fenólicos y otros ácidos orgánicos. De esta forma, en el colon se forman principalmente ácidos aromáticos como el benzoico, fenilacético, fenilpropiónico, hipúrico, así como γ -valerolactonas y ácidos valéricos. Además, los compuestos que alcanzan el colon bien porque no han sido absorbidos, bien porque son excretados a través de la bilis tras su absorción intestinal (circulación enterohepática) o derivados desde el enterocito a través de transportadores MRP, sufren desconjugación y deshidroxilación por la microflora colónica y ruptura a ácidos fenólicos simples (ácido hidroxibenzoico, hidroxipropiónico, hidroxifenilacético, dihidroxifenilacético, etc.) (Monagas y cols., 2010).

Los polifenoles absorbidos en el intestino delgado sufren una extensa conjugación durante el proceso de metabolización por acción del sistema enzimático de fase II. La enzima catecol-*O*-metiltransferasa (COMT) metila los grupos hidroxilo libres en posición orto-difenólica (Nielsen y cols., 1998), mientras que las fenol sulfotransferasas citosólicas (SULTs) se encargan de la sulfatación tanto en el hígado como en el colon de agliconas (Scalbert y Williamson, 2000). Por su parte, la UDP-glucuronosil transferasa (UGT) endoplasmática está formada por varias familias, de entre las que cabe destacar la UGT1A encargada de la glucuronidación de polifenoles en el intestino, hígado y riñones (Strassburg y cols., 1998). En el enterocito, las agliconas pueden ser mayormente transformadas en derivados glucuronidados, aunque también pueden formarse derivados sulfatados y metilados. En ocasiones, la metabolización de los polifenoles conduce a derivados diglucurónidos, disulfatos, metilsulfatos, metilglucurónidos, sulfoglucurónidos, etc., como es el caso de los derivados *O*-glucuronido-*O*-sulfato, *O*-diglucurónido y metil-*O*-diglucuronido de la quercetina, o los derivados metilsulfatados de epigallocatequina y epigallocatequin galato (Crozier y cols., 2009). Las procianidinas del cacao se han detectado en orina en su forma nativa con excepción de alguna forma

metilada; sin embargo, estos compuestos poliméricos sufren una extensa metabolización (Figura 9), mientras que sus monómeros, tales como la epicatequina, aparecen en forma *O*-sulfatada, *O*-glucuronidada y *O*-metil-*O*-sulfatada (Monagas y cols., 2010). Tras el consumo de café, junto a los principales ácidos fenólicos esterificados, otros metabolitos aparecen conjugados en plasma y orina como el ácido cafeico y sus derivados metilados ferúlico e isoferúlico, al igual que sus correspondientes dihidroderivados (Stalmach y cols., 2009).

El hígado es el principal órgano implicado en la metabolización de los polifenoles; sin embargo, no puede ser descartada la implicación de otros órganos como los riñones o la mucosa intestinal que también contienen enzimas implicadas en el metabolismo de los polifenoles (Hackett, 1986). Los metabolitos conjugados en el enterocito, junto con los metabolitos colónicos que no han sido excretados en las heces, son generalmente distribuidos a los distintos tejidos a través de la circulación sanguínea y finalmente eliminados por la orina.

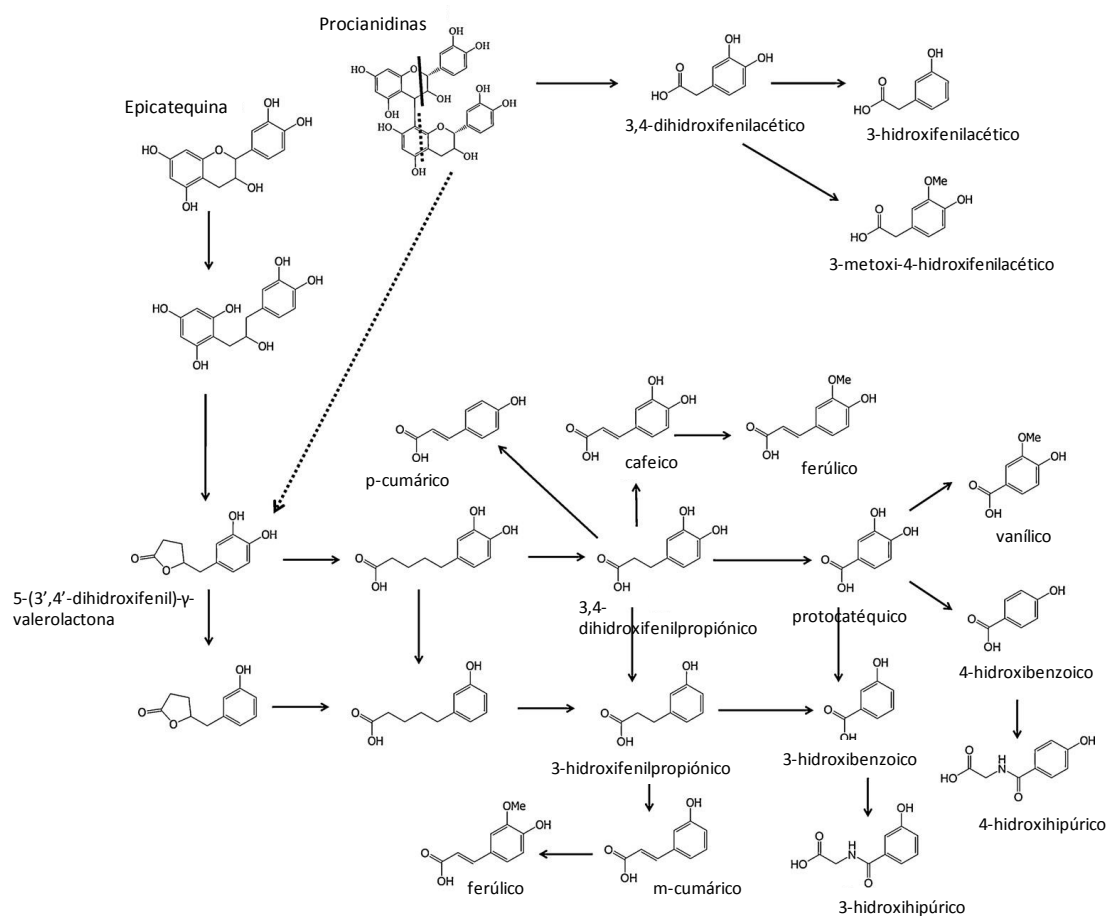


Figura 9. Ruta de degradación de procianidinas (tomado de Urpi-Sarda y cols., 2009).

➤ Niveles plasmáticos de polifenoles

Los estudios cinéticos han mostrado una absorción limitada de los polifenoles en el organismo humano. Manach y colaboradores (2005) revisaron 97 estudios de biodisponibilidad, ajustando los resultados a una ingesta de 50 mg de equivalentes de polifenoles totales en forma de aglicona. Atendiendo a la relación estructura-absorción, el ácido gálico parece ser el compuesto mejor absorbido ($C_{\max} = 4 \mu\text{M}$), seguido de las isoflavonas ($C_{\max} = 2 \mu\text{M}$), las flavanonas, la catequina y la quercetina, mientras que los fenoles complejos (taninos hidrolizables y condensados) son los compuestos más difícilmente absorbidos (Manach y cols., 2005).

La biodisponibilidad de polifenoles ha sido extensamente estudiada en alimentos como cacao y sucedáneos (Steinberg y cols., 2002; Urpi-Sarda y cols., 2009; Actis-Goretta y cols., 2012) o el café (Farah y cols., 2008; Stalmach y cols., 2009; Renouf y cols., 2010a, 2010b). Los flavan-3-oles del cacao, debido a su bajo peso molecular, son capaces de absorberse en el intestino delgado y entrar en el enterocito. Debido a su metabolización hepática por parte de las enzimas de fase II, estos monómeros han sido principalmente detectados en sangre como derivados glucuronidados, sulfatados y metilsulfatados (Actis-Goretta y cols., 2012). Por el contrario, las procianidinas, a pesar de sus elevadas concentraciones en cacao, tienen una absorción limitada debido su alto peso molecular, especialmente las de mayor grado de polimerización, y llegan inalteradas al colon donde son metabolizadas por la microflora a derivados de ácidos fenólicos. Así, mientras los monómeros son absorbidos en un 22%-55%, las procianidinas son hasta 100 veces menos absorbidas (<0,5%) (Baba y cols., 2001).

Los flavanoles presentes en cacao son detectados en plasma desde tan sólo 30 min después de su consumo y alcanzan concentraciones máximas (C_{\max}) de 0,08, 0,4 y $4 \mu\text{M}$ para procianidina B2, catequina y epicatequina, respectivamente, a las 2 h tras una ingesta de 12,2 mg de monómeros y 20,2 mg de procianidinas (Steinberg y cols., 2002). En cuanto a los metabolitos conjugados de epicatequina, se han encontrado $C_{\max} = 150\text{-}290 \text{ nM}$ para los derivados (-)-epicatequina-3'- β -D-glucurónido, (-)-epicatequina-3'-sulfato y 3'-O-metil-5-sulfato-epicatequina, con un 32, 24 y 17%, respectivamente, del total de monómeros conjugados tras la ingesta de 100 g de chocolate negro conteniendo 79 mg de epicatequina, 26 mg de catequina y 49 mg procianidina B2. Sin embargo, la permanencia en sangre de estos metabolitos raramente supera tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de 3,8 h, con excepción de la (-)-epicatequina-7- β -D-glucurónido observada 12 h tras la ingesta de chocolate, aunque en cantidades traza ($C_{\max} = 20 \text{ nM}$) (Actis-Goretta y cols., 2012). Además, cabe mencionar la presencia de ácidos fenólicos procedentes del metabolismo microbiano tras un consumo regular de cacao en polvo durante 4 semanas (Urpi-Sarda y cols., 2009), destacando la presencia de los ácidos

fenilacético y protocatéquico, con concentraciones medias de 20,3 y 10,5 μM , respectivamente, en el plasma recogido en ayunas, así como de las hidroxifenilvalerolactonas derivadas del metabolismo de fase II que no superaban concentraciones plasmáticas de 0,48 μM .

Sin embargo, tras el consumo de alimentos como el café, rico en ácidos hidroxicinámicos, se observa una mayor presencia de ácidos fenólicos y derivados hidroxicinámicos en sangre. Así, tras la ingesta de 200 mL de café que aportaban 412 μmoles de derivados hidroxicinámicos totales, correspondiendo un 29% al ácido clorogénico (5-CQA), la C_{max} para este compuesto sin metabolizar fue de 2,2 nM a $T_{\text{max}}=1\text{h}$, mientras que otros metabolitos derivados (ácido 3-*O*-sulfato-cafeico, ácido 4-*O*-sulfato-ferúlico y las lactonas sulfatadas de los ácidos 3-CQA y 4-CQA) alcanzaban $C_{\text{max}}=20\text{--}92\text{ nM}$ a $T_{\text{max}}=0,6\text{--}1\text{ h}$. Por otra parte, los ácidos dihidroderivados, como el dihidroferúlico, 4-*O*-sulfato-dihidroferúlico y 3-*O*-sulfato-dihidrocafeico alcanzan $C_{\text{max}}=145\text{--}385\text{ nM}$ a T_{max} mayores a 4 h, de acuerdo a su metabolización mayoritariamente colónica (Stalmach y cols., 2009). En cambio, la ingesta de un extracto de café verde conteniendo 120 μmoles de ácido clorogénico alcanza una concentración total de ácidos cafeoilquínicos de 8,2 μM en plasma, siendo 5-CQA el mayoritario con $C_{\text{max}}=5,9\text{ }\mu\text{M}$ a las 3,3 h, frente a $C_{\text{max}}=14,8\text{ }\mu\text{M}$ del total de derivados hidroxicinámicos (Farah y cols., 2008).

A la vista de la baja biodisponibilidad de los polifenoles, para mantener las concentraciones plasmáticas y garantizar sus propiedades fisiológicas sería aconsejable un consumo diario y reiterado en el tiempo (Scalbert y Williamson, 2000). No obstante, la presencia de otros componentes, en estas matrices alimentarias, tales como proteínas y carbohidratos, podrían limitar la biodisponibilidad de estos polifenoles, y afectar por tanto a su bioactividad (Schramm y cols., 2003). Así, aunque la adición de un 10% de leche no parece afectar a la farmacocinética de los compuestos fenólicos del café; sin embargo, la absorción de ácido cafeico y ferúlico es menor cuando se trata de café con crema (Renouf y cols., 2010b).

➤ Excreción urinaria de polifenoles

La gran variabilidad observada en la excreción urinaria de polifenoles atribuye tales diferencias a la composición de la microflora, y a las variaciones inter-individuales. Mientras que sólo el 1,4% de la quercetina ingerida o el 5% de los antocianos del vino tinto llegan a la orina, sugiriendo una posible excreción por la bilis, por el contrario las isoflavonas parecen ser los polifenoles mayoritariamente excretados, encontrando en orina hasta un 66% de la dosis de daidzeína ingerida, seguida por un 30% para la

epicatequina del cacao y entre 4-30% para las flavanonas de los cítricos (Manach y cols., 2005).

Sin embargo, de acuerdo a la extensa metabolización que sufren los flavan-3-oles y las procianidinas del cacao y sus productos derivados a nivel intestinal o por la microflora colónica, el perfil urinario en humanos muestra una gran variedad de metabolitos. Así, en las 10 primeras horas tras la ingesta de una barra de 100 g de chocolate, (-)-epicatequina-3'- β -D-glucurónido, (-)-epicatequina-3'-sulfato y 3'-O-metil-epicatequina-5-sulfato comprenden hasta un 69% de los metabolitos conjugados de epicatequina, mientras que entre las 10 y 24 h posteriores un 56% de los metabolitos de epicatequina excretados corresponden a (-)-epicatequina-7- β -D-glucurónido (Actis-Goretta y cols., 2012). Sin embargo, 24 h después de un consumo regular de cacao en polvo, otros metabolitos derivados se suman a los anteriores, procedentes de la microbiota intestinal, como es el caso de las hidroxifenil- γ -valerolactonas, o de la microbiota colónica, como los ácidos vanílico, hidroxifenilacéticos y especialmente la 5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona (Urpi-Sarda y cols., 2009). Adicionalmente, Rios y colaboradores (2003) observaron un incremento en la excreción de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxifenilpropiónicos tras la ingesta de chocolate. Atendiendo a estas observaciones, la presencia en orina de algunos metabolitos de origen bacteriano, tales como los ácidos 3-hidroxifenilacético y vanílico, está siendo utilizado en la actualidad como biomarcador de consumo de cacao (Llorach y cols., 2013).

Tras la ingesta de café conteniendo 412 μ moles de ácidos fenólicos e hidroxicinámicos de forma natural, un 29% del total de metabolitos excretados corresponde a los derivados del ácido clorogénico, incluyendo una elevada proporción de dihidrocafeicos y dihidroferúlicos derivados del metabolismo colónico en sus formas sulfatadas y glucuronidadas (8,4–37,1 μ mol) (Stalmach y cols., 2009), que alcanzan sus máximas concentraciones en torno a las 8-10 h (Renouf y cols., 2010a). Además, de acuerdo a la mayor proporción de ácidos fenólicos en el café verde, cabría esperar una mayor excreción de metabolitos que con el café tostado. Así, hasta 4 μ moles de 5-CQA, el único metabolito que permanece intacto tras su absorción, pueden llegar a eliminarse en la orina tras la ingesta de café verde (Farah y cols., 2008), comparado con los 2,2 μ moles observados por Stalmach y colaboradores (2009) al beber café tostado. De forma similar, la máxima excreción de dihidrocafeico podría alcanzar 97 μ moles, siendo además el ácido p-hidroxibenzoico el principal metabolito del café verde, con hasta 189 μ moles del mismo en orina (Farah y cols., 2008).

2.3.5. Propiedades fisiológicas e implicaciones en salud

La elevada ingesta de grasas saturadas es un conocido factor de riesgo cardiovascular; sin embargo, los estudios epidemiológicos llevados a cabo en la población francesa mostraban una baja incidencia de eventos cardiovasculares a pesar de su dieta rica en grasas saturadas. Curiosamente, en dicha población era de destacar el elevado consumo de vino tinto, cuyo contenido polifenólico de elevada actividad antioxidante parecía estar relacionado con un menor riesgo de aterosclerosis, lo que dio lugar a la formulación de la conocida como “Paradoja francesa” (Renaud y de Lorgeril, 1992) e impulsó el estudio sobre las posibles implicaciones en salud de los compuestos polifenólicos.

La capacidad de los polifenoles para unirse a macromoléculas de la dieta (carbohidratos y proteínas) y a los propios enzimas digestivos disminuye la digestibilidad de macronutrientes, mientras que su capacidad de quelar distintos minerales, incluidos micronutrientes, disminuye la biodisponibilidad de los mismos. Por estas razones, inicialmente se atribuyeron propiedades negativas como anti-nutriente a los polifenoles. Sin embargo, el conocimiento de los beneficios asociados a su consumo ha ido incrementando en los últimos años. Su presencia en plantas medicinales les confiere un importante papel en la prevención de diversas enfermedades, pero su principal interés científico se centró en su potencial como antioxidantes (Thompson y cols., 1976). La estructura química está directamente relacionada con la capacidad antioxidante. Así, la existencia de dobles enlaces conjugados en los anillos fenólicos y el alto grado de hidroxilación confieren a los polifenoles una elevada capacidad de captación y estabilización de radicales libres y ROS. Igualmente, la captación de metales como Fe y Cu impide su participación en reacciones tipo Fenton, implicadas en la generación de radicales libres (Bravo, 1998). Sin embargo, a altas dosis los polifenoles pueden ser pro-oxidantes (Holst y Williamson, 2008). Un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes de los sistemas biológicos ocasionaría un incremento de las ROS y, por tanto, el daño oxidativo a diversas macromoléculas. Este daño oxidativo está en la base de procesos fisiológicos como el envejecimiento, pero también de diversos procesos patológicos, como la aterosclerosis, cáncer, diabetes, etc. Sin embargo, una dieta rica en antioxidantes naturales, y más concretamente en polifenoles, ha mostrado un efecto protector frente a diversas patologías (Scalbert y cols., 2005).

2.3.5.1. Enfermedad cardiovascular

Los eventos cardiovasculares tienen múltiples causas, pero la mayoría proceden de complicaciones derivadas de la aterosclerosis y sus consecuencias; sin embargo, la nutrición juega un importante papel en el control de estos desórdenes. Numerosas evidencias epidemiológicas y estudios observacionales en animales y en humanos han asociado el consumo regular de alimentos ricos en polifenoles, principalmente en flavonoides, con un efecto cardioprotector en humanos (revisados en Habauzit y Morand, 2012). Hertog y colaboradores (1995) revisaron 16 estudios de cohorte en el meta-análisis denominado “Estudio de los siete países”, concluyendo que la ingesta de flavonoides estaba inversamente relacionada con la mortalidad por infarto de miocardio; sin embargo, otros autores advierten que la relación positiva entre polifenoles y salud cardiovascular aún es limitada (Hollman y cols., 2011). Recientemente, Peterson y colaboradores (2012) han revisado un total de 12 estudios de cohorte llevados a cabo en Europa y Estados Unidos, concluyendo una relación indirecta entre la ingesta de flavonoides y la mortalidad por enfermedad cardiovascular.

Los beneficios de los polifenoles en el sistema vascular surgen a raíz de sus propiedades antioxidantes, contribuyendo a mejorar el metabolismo lipídico y la función endotelial, reducir la presión sanguínea, inhibir la agregación plaquetaria y regular la respuesta inflamatoria (Vauzour y cols., 2010). El papel cardioprotector de los polifenoles en el metabolismo lipídico es el campo más ampliamente estudiado; sin embargo, este efecto a nivel lipídico ha dado lugar a ciertas controversias. Los datos en humanos son un tanto heterogéneos según la fuente de polifenoles estudiada (revisado en Hooper y cols., 2008). Tras la ingesta de cacao y aceite de oliva entre otros, diversos estudios han mostrado mejoras en el perfil lipídico de los voluntarios; sin embargo, la suplementación con té negro y soja no parece mostrar resultados concluyentes en los niveles séricos de CT, LDL-C y/o HDL-C (Manach y cols., 2005). De entre los posibles agentes reductores, cabe mencionar la acción de las catequinas por su capacidad para inhibir pasos críticos en la absorción intestinal del colesterol y otros lípidos (Koo y Noh, 2007). Además, atendiendo a las propiedades antioxidantes de estos polifenoles, estudios *in vitro* han mostrado un claro descenso en la oxidación de las lipoproteínas LDL en presencia de ciertos antioxidantes (Kerry y Abbey, 1997), confirmado en humanos tras la ingesta de flavonoles del cacao (Mathur y cols., 2002) o de ácido clorogénico del café (Yukawa y cols., 2004), evitando así el proceso aterogénico.

Otros estudios se han enfocado en los beneficios de los polifenoles a nivel endotelial. El efecto hipotensivo de los polifenoles se traduce en un aumento en la secreción de factores de relajación vascular (NO) y una inhibición de los factores de contracción (Endotelina-1). Como consecuencia de la actividad antioxidante de los

polifenoles, se reduce el daño oxidativo al NO por parte de los radicales libres. El consumo de té, vino tinto, cacao o soja contribuyen al mantenimiento de una correcta función endotelial tanto en sujetos sanos como en aquellos en riesgo cardiovascular o cerebrovascular (Vita, 2005), ya que los alimentos ricos en flavonoides favorecen una mayor biodisponibilidad de NO (Heiss y cols., 2007). Por su parte, el ácido clorogénico y/o sus metabolitos también han mostrado un descenso en la presión sanguínea de adultos sanos, aunque los mecanismos no han sido aún bien establecidos (Mubarak y cols., 2012).

En condiciones inflamatorias, el ácido araquidónico se metaboliza a tromboxano A₂ que activa las plaquetas; sin embargo, se piensa que los polifenoles, y más concretamente los flavonoides, son capaces de inhibir la formación de este activador plaquetario y ejercer así un efecto anti-trombótico. Las procianidinas presentes en el cacao podrían ser en gran parte responsables al inhibir la activación de las plaquetas en humanos (Rein y cols., 2000), aunque los polifenoles presentes en bebidas como el vino tinto (Freedman y cols., 2001) o el café (Natella y cols., 2008), entre otras, también parecen contribuir al efecto anti-plaquetario.

Los compuestos fenólicos han mostrado además propiedades anti-inflamatorias al inhibir la biosíntesis de prostaglandinas y, por tanto, la actividad ciclooxigenasa y lipoxigenasa, reduciendo así la liberación del ácido araquidónico (Nijveldt y cols., 2001). Aunque se sigue investigando sobre los mecanismos de actuación, los polifenoles parecen estar implicados en la menor formación de mediadores inflamatorios en el endotelio, reduciendo por tanto la formación de la placa aterosclerótica. Así, epicatequingalato y quercetina parecen activar el transportador ABCA1, reducir los niveles de proteínas quimiotácticas, como la MCP-1, e inhibir la producción de PCR (González y cols., 2011). Una reducción en los niveles plasmáticos de moléculas de adhesión sICAM-1 y sVCAM-1 vía NF- κ B se asocia a la ingesta de resveratrol en un modelo animal con riesgo de desarrollar aterosclerosis (Do y cols., 2008), aunque este polifenol también parece reducir la secreción de citoquinas de activación general, como IL-6 y TNF- α .

2.3.5.2. Diabetes y Obesidad

Los compuestos polifenólicos son además capaces de inhibir la absorción de glucosa y, por tanto, disminuir sus niveles en sangre (Scalbert y cols., 2005). La atenuación de la glicemia postprandial y la mejora en la secreción de insulina podría llevarse a cabo por diversos mecanismos, tales como la inhibición de la digestión de carbohidratos, la estimulación de las células pancreáticas β , la activación de los receptores de insulina y de glucosa en tejidos periféricos y la modulación de señales intracelulares en tejidos

diana, mejorando la sensibilidad tisular a la insulina (Andújar y cols., 2012). Además, los flavonoides parecen inhibir la actividad de las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa, así como el transporte mediado por GLUT2, por lo que la ingesta de flavonoides, y más concretamente de flavanoles, ha sido inversamente asociada a la incidencia de hiperglucemia y diabetes mellitus tipo 2, aunque la evidencia sigue siendo limitada (Zamora-Ros y cols., 2013). Grassi y colaboradores (2008) observaron una mayor sensibilidad a insulina tras la ingesta de chocolate. Por su parte, los derivados hidroxycinámicos, principalmente el ácido clorogénico, parecen reducir la absorción intestinal de glucosa (Meng y cols., 2013). Es por ello que el consumo regular de café, cuyo principal componente polifenólico es el ácido clorogénico, reduce el riesgo de padecer diabetes hasta un 30% al activar la acción de la insulina y mejorar la tolerancia a glucosa (Huxley y cols., 2009).

Por otro lado, la obesidad es un estado inductor de diabetes y ECV que parece mejorar en respuesta a la acción biológica de los polifenoles. Hasta la fecha, se han identificado una variedad de mecanismos moleculares por los que los polifenoles de la dieta podrían contribuir a un efecto protector en los trastornos asociados a la obesidad. Diversos receptores actúan inhibiendo la adipogénesis en distintos puntos del ciclo de los adipocitos. De entre ellos, los polifenoles promueven la expresión de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR α y PPAR γ) que favorecen la oxidación de los ácidos grasos y de las proteínas C/EBP α , al mismo tiempo que inhiben los receptores hepáticos X (LXR α) implicados en la síntesis de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos (Ali y cols., 2014; Siriwardhana y cols., 2013). De esta forma, los polifenoles inhiben la lipogénesis en el hígado y el tejido adiposo, al mismo tiempo que activan la β -oxidación de las grasas en la mitocondria y la termogénesis. Una reducción en la ganancia de peso y el porcentaje de grasa corporal, así como en la acumulación de lípidos en los hepatocitos y de colesterol plasmático es el resultado de la suplementación dietética con flavonoides (Pan y cols., 2010). De forma similar, los derivados hidroxycinámicos aumentan el metabolismo energético y reducen la lipogénesis gracias a una menor actividad de SREBP-1 (sterol regulatory element-binding protein 1), contribuyendo así a una menor acumulación de grasas (Murase y cols., 2011).

La inflamación en el tejido adiposo está relacionada con la resistencia a insulina. Mientras algunos compuestos bioactivos suprimen la expresión de adipoquinas pro-inflamatorias, otros favorecen la expresión de adiponectina, cuyos niveles son deficientes en casos de diabetes tipo 2 (Fantuzzi, 2008).

2.3.5.3. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas, tales como Parkinson y Alzheimer, representan un problema creciente en la sociedad que podría prevenirse reduciendo los niveles de estrés oxidativo. La activación de microglía y astrocitos y la producción de citoquinas y ROS por dichas células gliales, son procesos cruciales en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Pan y cols., 2010). Sin embargo, gracias a su poder antioxidante, los flavonoides parecen reducir el daño por protección y regeneración neuronal. Así, la menor agregación de péptido amiloide β ($A\beta$) en las células neuronales por acción de catequina y epicatequina podría deberse a la habilidad de estos compuestos para quelar metales que interactúan con $A\beta$, disminuyendo la producción de ROS (Albarracín y cols, 2012).

No obstante, los mecanismos implicados en la prevención de estos desórdenes neuronales aún son inciertos, siendo necesario un estudio más completo para establecer las dosis necesarias y la forma de administración de los polifenoles con potencial neuro-protector.

2.3.5.4. Cáncer

La incidencia del cáncer es cada vez más evidente, siendo en la actualidad uno de los objetivos prioritarios de la investigación biomédica la búsqueda de herramientas para su prevención y tratamiento. En un meta-análisis llevado a cabo por Steinmetz y Potter (1996) se observó que un mayor consumo de frutas y hortalizas se asociaba a una menor incidencia de cáncer de esófago, estómago, pulmón, páncreas, colon y faringe.

Los agentes carcinógenos e inflamatorios son capaces de modular diversos factores implicados en el crecimiento de células tumorales. Sin embargo, el consumo diario y regular de alimentos ricos en polifenoles, tales como té, cacao, vino o aceite de oliva, parece evidenciar un efecto protector frente al desarrollo de cáncer y metástasis (Weng y Yen, 2012). Algunos fitoquímicos de la dieta, tales como isoflavonas, catequinas y resveratrol entre otros, inhiben el proceso inflamatorio, la proliferación de células cancerígenas, la angiogénesis y la metástasis. Estos efectos podrían ser mediados por diversos mecanismos. Así, los polifenoles incrementan los niveles de proteínas pro-apoptóticas en células tumorales, al mismo tiempo que actúan como agentes supresores inhibiendo la proteína quinasa C (PKC) y la ciclooxygenasa 2 (COX-2), relacionadas con el crecimiento tumoral, y modifican la actividad de factores de transcripción implicados en la supervivencia y proliferación celular, como NF- κ B o el AP-1 (activator protein-1), regulando la activación de proteínas pro- y anti-apoptóticas (bcl-2, bcl-2, etc.), factores de

crecimiento implicados en angiogénesis (VEGF, bFGF) y metástasis (MMP, IGF, EGF), etc. (Aggarwal y Shishodia, 2006). Además, estos fitoquímicos modulan citoquinas promotoras de la angiogénesis, tales como IL-1 β e IL-6 (Pan y cols., 2010).

Por otra parte, estos fitoquímicos activan factores de transcripción como el Nrf2 que a través de su unión a elementos de respuesta antioxidante (Antioxidant Response Element, ARE) activan la expresión de genes diana implicados en el mantenimiento del balance redox celular (activación de enzimas antioxidantes y síntesis de glutatión), supresión de señales pro-inflamatorias (COX-2, LOX, citoquinas). Todo ello lleva a una protección celular frente a la iniciación, promoción y progresión del proceso carcinogénico, inhibiendo angiogénesis y metástasis.

2.4. Metilxantinas

2.4.1. Definición y aspectos generales

Las xantinas son una variedad de sustancias pertenecientes a la familia de las purinas, entre las que se incluyen sustancias endógenas tan importantes como la guanina, adenina, hipoxantina y ácido úrico, todas ellas compartiendo una base nitrogenada heterocíclica. Los derivados N-metilados de las xantinas, conocidos como metilxantinas, son metabolitos secundarios de las plantas de naturaleza orgánica. Las metilxantinas han sido encontradas en casi 100 especies de plantas; sin embargo, sólo algunas de ellas contienen altas concentraciones, tales como *Coffea arabica* (café), *Camellia sinensis* (té) y *Theobroma cacao* (cacao). Se consideran sustancias alcaloides que producen, principalmente, efectos estimulantes y por ello su presencia en gran parte de bebidas convierte a las metilxantinas en las sustancias estimulantes más consumidas por el hombre.

2.4.2. Clasificación

Las tres principales metilxantinas son cafeína, teobromina y teofilina, presentes de forma natural en la dieta. Además, teobromina y teofilina pueden proceder del metabolismo de la cafeína junto con otros metabolitos secundarios. En función del número de sustituyentes metilo y del nivel de oxidación de la molécula, las metilxantinas se clasifican en (Figura 10):

- Trimetilxantinas ($C_8H_{10}N_4O_2$): La cafeína (CF) es la única xantina trimetilada (1,3,7-metilxantina). Está presente en bebidas como mate, café, té, bebidas energizantes y bebidas de cola.
- Dimetilxantinas ($C_7H_8N_4O_2$): Las xantinas dimetiladas mayoritarias en la dieta son teobromina (TB, 3,7-metilxantina) y teofilina (TP, 1,3-metilxantina). Existe un tercer isómero dimetilado, la paraxantina (PX, 1,7-metilxantina), que no se encuentra de forma natural en los alimentos, procede exclusivamente del metabolismo de la CF.
- Monometilxantinas ($C_6H_6N_4O_2$): Las xantinas monometiladas están representadas por los isómeros 1-metilxantina (1-MX), 3-metilxantina (3-MX) y 7-metilxantina (7-MX), siendo productos formados durante el metabolismo de tri- y di-metilxantinas.
- Ácidos metilúricos: estos ácidos orgánicos son el producto de oxidación de las metilxantinas. Según el precursor del que proceda (tri-, di- o mono-metilxantina), los derivados metilúricos son el ácido 1,3,7-trimetilúrico (1,3,7-MU), también conocido como 8-oxocafeína ($C_8H_{10}N_4O_3$), los ácidos 1,3-, 1,7- y 3,7-dimetilúricos (1,3-MU, 1,7-MU y 3,7-MU, respectivamente, $C_7H_8N_4O_3$) y los derivados 1-, 3- y 7-monometilúricos (1-MU, 3-MU y 7-MU, respectivamente, $C_6H_6N_4O_3$).

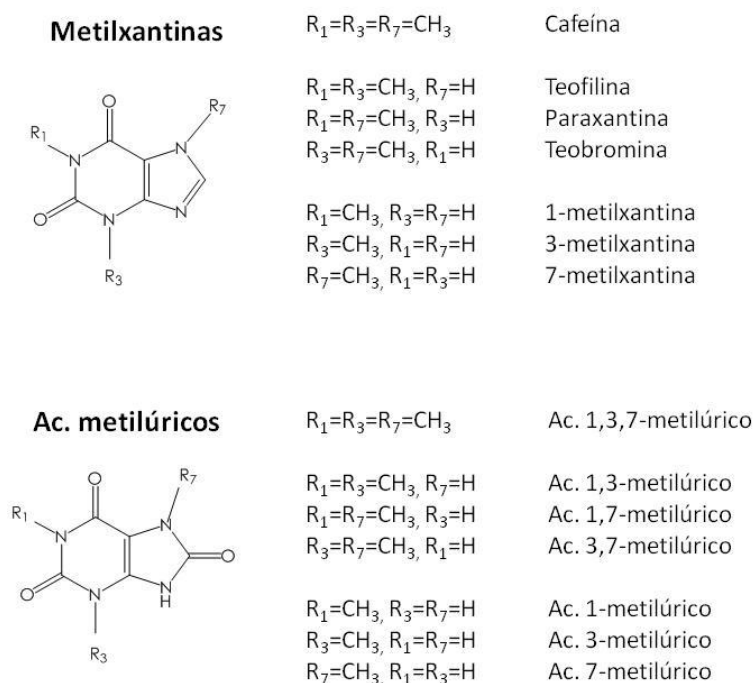


Figura 10. Estructura química de metilxantinas y ácidos metilúricos.

2.4.3. Las metilxantinas en la dieta y su ingesta

Las metilxantinas son consumidas a diario por gran parte de la población debido a su presencia natural en hojas de té y yerba mate, semillas de café y cacao, y en nuez de cola, así como en sus bebidas y productos derivados. Además, estos alcaloides han sido adicionados como ingredientes en algunos alimentos, suplementos dietéticos y medicamentos.

La principal fuente de CF en la dieta es el café, que aporta el 75% de la ingesta de esta trimetilxantina, siendo el 25% restante procedente del té y otras bebidas energéticas (Lundsberg, 1998). El cacao y sus productos derivados constituyen la fuente mayoritaria de TB en la dieta, aunque en café, mate y té también se han detectado ciertas cantidades de esta metilxantina dependiendo de la variedad. Por el contrario, TP es la minoritaria de las metilxantinas encontradas de forma natural en los alimentos. La Tabla 4 resume la composición de algunos de los alimentos que contienen metilxantinas de forma natural.

Tabla 4. Composición de metilxantinas (mg/g) en diferentes alimentos.

	Cafeína	Teobromina	Teofilina
Café^{a, b}	16,1-38,6	0,5-2,3	< 0,003
Café verde^c	10,5-26,7	-	-
Cacao^d	3,1-6,6	16,2-26,9	trazas
Chocolate^e	0,1-2,4	1,5-16,4	-
Té^b	6,8-23,8	0,01-1,8	-
Yerba mate^f	3,2-6,7	0,4-2,4	< 0,003

^a De Aragao y cols., 2005; ^b Tzanavaras y cols., 2010; ^c Alonso-Salces y cols., 2009; ^d Ramli y cols., 2001; ^e Langer y cols., 2011; ^f Cardozo y cols., 2007.

2.4.4. Biodisponibilidad y metabolismo de metilxantinas

Diversos factores que influyen en el metabolismo de las metilxantinas han sido estudiados y revisados por Arnaud (2011), desde la genética (edad, sexo, hormonas), hasta otros factores como la actividad física, la obesidad, la dieta, el consumo de tabaco o alcohol, la interacción con medicamentos y la ocurrencia de enfermedades.

En general, las metilxantinas administradas tanto a humanos como a animales son absorbidas rápida y completamente en el tracto gastrointestinal, principalmente en el intestino delgado, aunque estudios realizados con goma de mascar conteniendo CF muestran también la rápida absorción de esta metilxantina a nivel oral (Kamimori y cols., 2002). También por vía rectal se produce la absorción de metilxantinas, si bien las concentraciones plasmáticas y/o la velocidad de absorción puede variar respecto a la vía oral (Teekachunhatean y cols., 2013). Igualmente, la CF puede ser absorbida tras inhalación a través de la mucosa nasal, aunque la biodisponibilidad por esta vía es menor que oralmente (60%) (Zandvliet y cols., 2005). El género, ciclo menstrual, embarazo, realización de ejercicio físico, etc. no parecen afectar a la biodisponibilidad de las metilxantinas (Latini y cols., 1984; McLean y Graham, 2002; Kamimori y cols., 1999). Sin embargo, el metabolismo de metilxantinas difiere en neonatos frente a adultos (Ginsberg y cols., 2004). Igualmente, el consumo de tabaco o situaciones patológicas como alteraciones en el vaciado gástrico (estasis gástrica), hiperlipidemia o enfermedades hepáticas tales como cirrosis o hepatitis, también afectan la absorción y metabolismo de estos compuestos (Brachtel y Richter, 1988; Rodopoulos y cols., 1995; Wójcicki y cols., 1996; Zevin y Benowitz, 1999; Jodynis-Liebert y cols., 2004). De hecho, el estudio del perfil de eliminación urinaria de metabolitos derivados de la CF es ampliamente utilizado como test de función hepática (Rodopoulos y cols., 1995; Jodynis-Liebert y cols., 2004).

Tras su absorción, las metilxantinas son metabolizadas a otras metilxantinas con menor grado de metilación y, mediante reacciones de oxidación, a ácidos metilúricos en el hígado (Rodopoulos y cols., 1995). Las metilxantinas pueden transformarse mediante tres rutas metabólicas (Figura 11). En el caso de la CF, la ruta de la PX ha mostrado ser la predominante con un rendimiento del 80%, seguida de la ruta de la TB (12%) y de la TP (7%) (Atia y cols., 2009). De esta forma, en un primer paso más de un 90% de CF es metabolizado, produciendo principalmente PX, seguida de TB y TP, y en menor proporción ácido 1,3,7-MU (Eteng y cols., 1997).

La enzima xantina oxidasa (XO) es la principal responsable de convertir las xantinas a ácidos úricos; sin embargo, esta enzima no es capaz de metabolizar compuestos metilados, tales como CF y sus derivados. En humanos, diferentes isoformas de la familia del citocromo P450 (CYP), presentes únicamente en microsomas hepáticos, son capaces de metabolizar las metilxantinas por reacciones de desmetilación y de hidroxilación (Robson, 1992). La N1-, N3- y N7-desmetilación de CF produce TB, PX y TP, respectivamente. La conversión de CF en PX por N3-desmetilación es exclusivamente mediada vía CYP1A2, mientras que esta isoforma contribuye parcialmente a la N1- y N7-desmetilación para la formación, respectivamente, de TB y TP, conversión en la que la isoforma CYP2E1 juega también un importante papel (Gu y cols., 1992; Kot y Daniel, 2008a). CYP1A2 también participa en la C8-hidroxilación de CF a ácido 1,3,7-MU,

sustancialmente mediada también por CYP3A4 (Kot y Daniel, 2008a). La biotransformación reversa de TP a CF por una reacción de metilación fue inicialmente demostrada en bebés (Bory y cols., 1979; Ginsberg y cols., 2004), si bien este retro-proceso no ha sido observado en adultos ni con otros metabolitos.

En el estudio del metabolismo de metilxantinas ha de tenerse en cuenta las diferencias entre especies pues mientras el principal metabolito de la CF en el hombre es la PX, mediada por CYP1A2, esta isoforma lleva a la formación de 1,3,7-MU como metabolito mayoritario en rata, siendo la C8-hidroxilación de CF la ruta metabólica predominante en esta especie (Kot y Daniel, 2008b).

Las mono-metilxantinas son los productos de N-desmetilación de las di-metilxantinas, pudiendo derivar al mismo tiempo de dos de las rutas metabólicas. 1-MX procede de las rutas de TP y de PX, con el CYP1A2 implicado en ambas vías de transformación. La 3-MX es el principal metabolito derivado de la TB a través de diversas isoenzimas del citocromo P450 (CYP1A2/CYP2A6/CYP2E1), aunque la TP puede también degradarse por acción de la CYP1A2. La 7-MX podría obtenerse por desmetilación de PX y/o TB catalizada por la isoenzima CYP1A2.

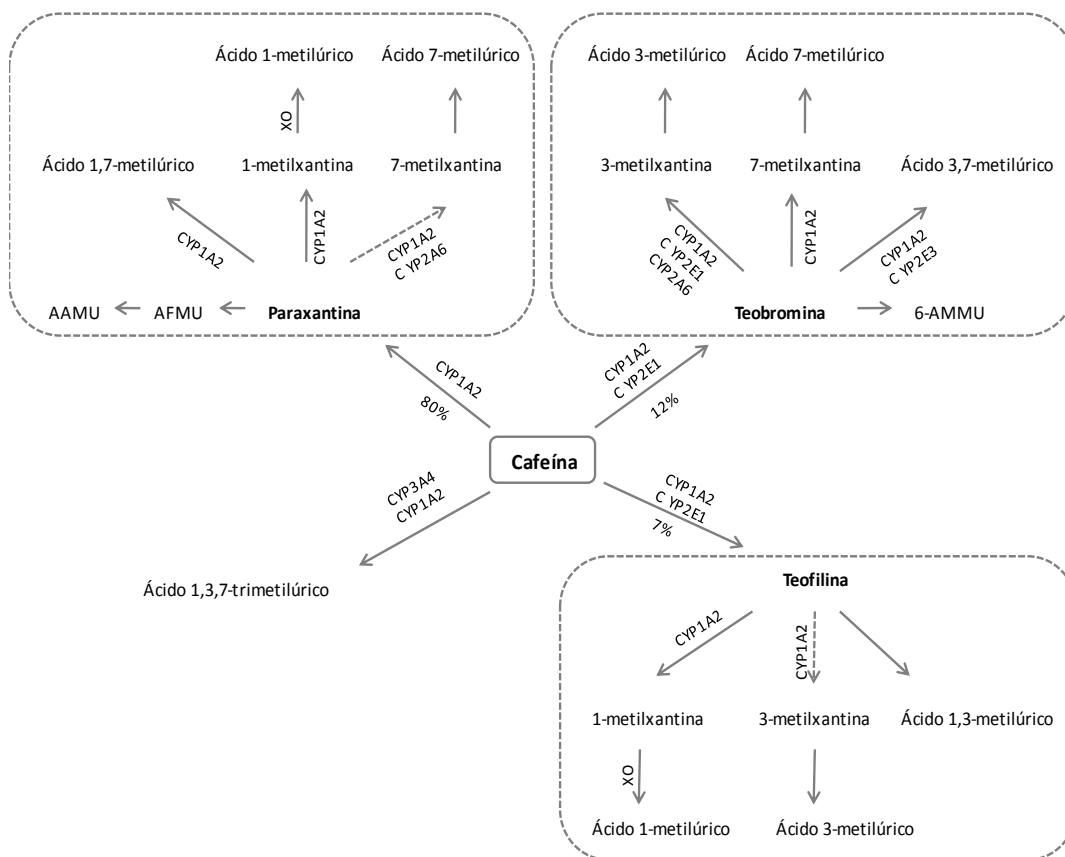


Figura 11. Rutas metabólicas derivadas de la cafeína. Las flechas sólidas indican la ruta preferente de metabolización. Las flechas discontinuas señalan una ruta no preferencial. AAMU: 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracilo; AFMU: 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo; 6-AMMU: 6-amino-5(N-metilformilamino)-1-metiluracilo; CYP: citocromo P450; XO: xantina oxidasa.

La biotransformación de metilxantinas en ácidos metilúricos sigue un proceso de hidroxilación. Como ya se ha comentado, aunque en menor medida, la CF también es metabolizada a ácido 1,3,7-MU por hidroxilación vía CYP3A4 (Tassaneeyakul y cols., 1994). La C8-oxidación de las di-metilxantinas PX, TB y TP lleva a la formación de sus correspondientes ácidos dimetilúricos 1,7-, 3,7- y 1,3-MU, respectivamente, por acción de las diversas isoenzimas del citocromo P450. De la misma forma, las mono-metilxantinas son también oxidadas a ácidos mono-metilúricos (1-MU, 3-MU y 7-MU), siendo XO la responsable de la correspondiente oxidación de 1-MX (Figura 11). Otro importante paso metabólico es la conversión hidrolítica de TB en el derivado 6-amino-5(N-metilformilamino)-1-metiluracilo (6-AMMU) y de PX en los derivados N-acetilados 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo (AFMU) y 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracilo (AAMU), catalizada por N-acetiltransferas hepáticas no microsomales (Rodopoulos y cols., 1995).

➤ Niveles plasmáticos de metilxantinas

La biodisponibilidad de metilxantinas ha sido mayoritariamente estudiada en plasma y orina, aunque algún estudio ha considerado también otros métodos no invasivos como el análisis en saliva (Rodopoulos y Norman, 1996; Rodopoulos y cols., 1996; Rodopoulos y Norman, 1997; Perera y cols., 2011; Ptolemy y cols., 2010).

La CF es rápida y totalmente absorbida en el tracto digestivo, detectándose en plasma desde los 10 minutos tras su ingesta (Teekachunhatean y cols., 2013). Las concentraciones plasmáticas máximas de CF se observan a tiempos cortos (entre 30-60 minutos), mostrando un tiempo de vida media de aproximadamente 5 h (Perera y cols., 2011; Crozier y cols., 2011). Como resultado de la metabolización de CF, los principales metabolitos secundarios encontrados son PX, TB y TP, habiéndose reportado en plasma en proporción de 63:27:10 (Rodopoulos y Norman, 1996). Además, otros compuestos, tales como las monometilxantinas o el ácido 1,7-MU podrían detectarse en menores concentraciones (Lang y cols., 2013).

La propia CF alcanza concentraciones máximas superiores a las de sus metabolitos. Así, tras el consumo de café aportando dosis de CF comprendidas entre 100 y 375 mg, se han observado concentraciones plasmáticas de CF entre 13-33 μM (Kumazawa y cols., 1999; Lang y cols., 2013; Teekachunhatean y cols., 2013). En un estudio donde bebedores habituales de café consumieron *ad libitum* esta bebida a lo largo del día se observaron concentraciones plasmáticas medias de CF de 22,7 μM , con niveles de PX, TB y TP de 11,7, 4,4 y 1,7 μM , respectivamente (Lelo y cols., 1986), confirmando la proporción de dimetilxantinas arriba señalada. Además de su rápida absorción, la CF ha mostrado una respuesta dosis-dependiente al aumentar la cantidad ingerida de esta metilxantina (Cheng y cols., 1990); sin embargo, algunos autores advierten de una pérdida de la linealidad cuando la ingesta supera los 250 mg por taza de café (Heckman y cols., 2010).

Tras el consumo de TB, ésta es la principal metilxantina observada en plasma, superando en un orden de magnitud los niveles de sus principales metabolitos (Rodopoulos y cols., 1996). Dada la ruta de metabolización seguida por esta dimetilxantina (Figura 11), cabría esperar la detección en plasma de algunos de sus correspondientes metabolitos derivados, tales como la 3- y 7-monometilxantina y los ácidos 3-, 7- y 3,7-MU. Así, el metabolito mayoritario de la TB es la 7-MX (30%) seguido de 3-MX (20%), ácido 7-MU (4%) y pequeñas cantidades de ácido 3,7-MU (Ellam y Williamson, 2013). Sin embargo, los datos referentes a la farmacocinética de esta dimetilxantina son escasos. Tras la administración oral de 500 mg de TB en cápsulas, el área bajo la curva de esta metilxantina fue de 505 μM , con valores de 55 y 43 μM para los metabolitos 7-MX y 3-MX, respectivamente, con un tiempo de semivida para la TB de

aproximadamente 8 horas (Rodopoulos y cols., 1996). Un estudio con un único voluntario que consumió una bebida de cacao conteniendo 315 mg de TB y 53 mg de CF mostró niveles plasmáticos de ambas metilxantinas de 30 y 3,1 μM , respectivamente (Kumazawa y cols., 1999). Ptolemy y colaboradores (2010) reportaron concentraciones plasmáticas superiores a 40 μM en voluntarios tras el consumo de chocolatinas que proporcionaron 376 mg de TB, si bien las concentraciones basales fueron relativamente altas al no haberse restringido el consumo de alimentos ricos en metilxantinas antes del estudio. El consumo de 370 mg de TB tanto en cápsulas como en chocolate resultó en concentraciones plasmáticas también en torno a 40 μM (Mumford y cols., 1996), detectándose las concentraciones máximas en torno a las 2-3 horas. Por otro lado, la presencia natural, aunque minoritaria, de CF en algunos productos de cacao explicaría la detección en plasma de esta trimetilxantina y de algunos de sus metabolitos derivados, tales como TP, PX y sus correspondientes monometilxantinas y derivados metilúricos.

Respecto a la TP, la información sobre su biodisponibilidad deriva principalmente de estudios farmacocinéticos asociado al interés terapéutico de esta purina. La administración de 540 mg de TP en cápsulas resultó en valores de área bajo la curva de cerca de 900 μM , observándose como principales metabolitos plasmáticos 3-MX y los ácidos 1,3-MU y 1-MU, con un tiempo de semivida de aproximadamente 7 horas (Rodopoulos y Norman, 1997). La absorción de TP es rápida y total, pudiendo ser retrasada por el consumo de alimentos (Jonkman y cols., 1985), si bien no existen datos sobre la absorción de esta metilxantina contenida en alimentos.

De lo anteriormente expuesto se deduce que el metabolismo de metilxantinas ha sido evaluado en humanos mayoritariamente por administración directa del compuesto puro. Sin embargo, la biodisponibilidad de metilxantinas naturalmente presentes en los alimentos puede estar influenciada por el efecto matriz o por la presencia de otros ingredientes. En humanos, la biodisponibilidad relativa de la TB tras el consumo de chocolate fue de un 80% en comparación con la ingesta de TB pura en solución (Shively y cols., 1985). Igualmente, se ha observado una absorción de TB más lenta y menor concentración plasmática cuando ésta se ingirió en forma pura (cápsulas) frente al consumo de chocolate (Mumford y cols., 1996). Por el contrario, estos mismos autores observaron una absorción más rápida de CF y mayores niveles plasmáticos tras la administración en forma de cápsulas que en una bebida de cola o en chocolate. Por tanto, la forma de administración de estos alcaloides afecta su biodisponibilidad y farmacocinética. Igualmente, las condiciones fisiológicas influyen en la biodisponibilidad de estos alcaloides, observándose un metabolismo más lento en pacientes con cirrosis, aumentando la ruta de la TB a expensas de la ruta de PX (Rodopoulos y Norman, 1994; Rodopoulos y cols., 1995), aunque la absorción de CF también se ha visto influenciada por la vía de administración, observando una C_{max} hasta 3,5 veces mayor tras beber una

taza de café que si se administra en forma de un enema de administración rectal (Teekachunhatean y cols., 2013).

➤ Excreción urinaria de metilxantinas

La principal ruta de eliminación de las metilxantinas y sus metabolitos es por vía urinaria. Las monometilxantinas y los ácidos metilúricos, metabolitos derivados de la biotransformación de tri- y dimetilxantinas pobremente presentes en plasma, son los compuestos mayoritarios en orina. La baja presencia plasmática de estos derivados frente a su elevada presencia en orina indica un rápido metabolismo de los mismos en el organismo humano. Al contrario que en plasma, las metilxantinas originales son escasamente eliminadas en orina, de modo que sólo un 2-3% de CF se excreta sin metabolizar en individuos sanos (Rodopoulos y Norman, 1994; Schneider y cols., 2003) y menos de un 1% de la TP ingerida en el caso de administración de esta metilxantina (Zydrón y cols., 2004), aunque estos porcentajes pueden llegar hasta el 6% del total de metabolitos urinarios en el caso de la CF y TP administradas a pacientes con insuficiencia hepática o asmáticos, respectivamente (Rodopoulos y Norman, 1994; Zydrón y cols., 2004). En el caso de la TB, su eliminación urinaria sin metabolizar puede alcanzar niveles superiores, de hasta el 20% del total de metabolitos (Rodopoulos y cols., 1996).

Rodopoulos y Norman (1994) identificaron hasta un total de 16 metabolitos en orina de voluntarios sanos tras la administración oral de 200 mg de CF, incluidos los metabolitos AAMU y AFMU. Los metabolitos mayoritarios fueron el ácido 1-MU, 1-MX, 1,7-MU, PX y AAMU+AFMU, representando entre el 70-85% de los metabolitos urinarios de la CF. El ácido 1-MU ha mostrado ser el principal analito derivado, alcanzando hasta un 46% del total de metabolitos excretados (Ullrich y cols., 1992), seguido de 1-MX y el ácido 1,7-MU (Bonati y cols., 1982; Schneider y cols., 2003). Tras la ingesta de café (4 mg de CF por kilogramo de peso), Schneider y colaboradores (2003) encontraron concentraciones de 1-MU de hasta 400 μ M y valores similares de AAMU+AFMU. La elevada presencia de estos metabolitos urinarios confirma la teoría demostrada por diversos autores de la mayor implicación de la ruta de la PX en el metabolismo de la CF (Gu y cols., 1992; Rodopoulos y cols., 1996; Arnaud, 2011).

El perfil urinario tras el consumo de TB pura muestra como metabolitos mayoritarios 7-MX (36%), 3-MX (21%), 6-AMMU (11%) y el ácido 7-MU (10%), junto con la propia TB (20%) (Rodopoulos y cols., 1996). Resultados similares se obtuvieron tras la administración de TB marcada radioactivamente, con un 42% de la radioactividad urinaria correspondiente a 7-MX, un 20% a 3-MX, un 18% a TB, un 10% a 7-MU y un 10% a 6-AMMU, confirmando así la elevada eliminación urinaria de TB sin metabolizar (Shively y cols., 1985). Tras el consumo de chocolate, con un aporte de TB de 375 mg, se

han cuantificado concentraciones urinarias de esta metilxantina en torno a 100 μM (Schneider y cols., 2003). Hasta 490 μM de TB procedente del cacao podría ser excretada junto a una pequeña fracción de la CF ingerida, que es excretada sin metabolizar (6,7 μM) tras el consumo de un producto soluble de cacao conteniendo 53 mg de CF y 315 mg de TB (Kumazawa y cols., 1999).

En el caso de la TP, los principales metabolitos urinarios son 1,3-MU (41% del total de metabolitos), 1-MU (26%) y 3-MX (11%) (Rodopoulos y Norman, 1997).

En determinadas circunstancias, el metabolismo de las metilxantinas podría verse alterado, como es el caso de mujeres embarazadas y neonatos. La CF ha sido encontrada en la orina de los bebés durante los 3 primeros meses de vida, probablemente debido a una ralentización de la N-desmetilación tanto en el bebé como en la madre (Aldridge y cols., 1979).

2.4.5. Propiedades fisiológicas y efectos en salud

La adenosina es una purina formada y liberada en situaciones de estrés metabólico o por falta de oxígeno. Una vez sintetizada se une a sus receptores (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3) presentes en varios tejidos e inhibe el SNC, produciendo relajación muscular y vasodilatación. La similitud estructural entre metilxantinas y adenosina es la responsable del papel antagonista de las primeras, que son capaces de acoplarse a los receptores de adenosina y bloquearlos, generando así una elevada actividad neuronal.

El estudio de los efectos de las metilxantinas ha dado lugar tradicionalmente a muchas controversias. Las principales reacciones adversas asociadas a estos alcaloides han sido alteración del ritmo cardiaco, incremento de la presión sanguínea, nerviosismo, reducción de la fertilidad e insomnio (Chou y Benowitz, 1994; Nurminen y cols., 1999); sin embargo, tales efectos negativos parecen ser consecuencia de una dosis excesiva de metilxantinas. Así mismo, las metilxantinas, y más concretamente la CF, dificultarían el metabolismo de la glucosa, además de reducir la sensibilidad a insulina (Johnston y cols., 2003). Diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo recientemente no sólo contradicen las primeras observaciones, sino que incluso apuntan a un efecto beneficioso. Como consecuencia, se tiende a pensar que los efectos adversos que hasta ahora se habían descrito para la CF podrían deberse no sólo a un consumo en exceso, sino también a la sinergia con otros factores tales como tabaquismo, alcoholismo, inactividad física, etc.

La capacidad antioxidante de los fitoquímicos presentes en las plantas ha sido generalmente asociada a los compuestos polifenólicos. Sin embargo, las metilxantinas

podrían también estar implicadas en los procesos quimioprotectores. Atendiendo a las similitudes estructurales entre las xantinas, la capacidad del ácido úrico para inhibir el daño oxidativo debería poder extrapolarse a las metilxantinas. Por ello, las metilxantinas también han mostrado capacidad antioxidante medida *in vitro* (Azam y cols., 2003).

Los efectos beneficiosos de las metilxantinas están íntimamente relacionados con su actividad antagonista de los receptores de adenosina y, por tanto, con sus propiedades estimulantes. A continuación se resumen las acciones de las metilxantinas que pueden observarse a varios niveles del organismo humano.

2.4.5.1. Enfermedades cardiovasculares

Recientemente, algunos autores han apuntado a un efecto protector ante situaciones de riesgo cardiovascular (López-García y cols., 2009). Hasta ahora un aumento de HDL-C en suero tras el consumo de cacao y sus derivados era asociado a los flavonoides, pero recientemente se ha sugerido que la TB sería también responsable de este efecto (Neufingerl y cols., 2013).

Por otro lado, es bien conocido que la exposición a CF incrementa la presión arterial (PA), incluso en individuos sanos, como consecuencia del incremento de los niveles de epinefrina y norepinefrina. Sin embargo, estudios usando cápsulas de CF pura observaron mayores efectos que tras beber café, sugiriendo que otros componentes del café podrían contrarrestar los efectos adversos de la CF (revisado en Riksen y cols., 2011).

2.4.5.2. Sistema Nervioso Central

Los mayores beneficios de las metilxantinas derivan de sus propiedades estimulantes. Una mejora en el estado de ánimo y la sensación de bienestar (Kaplan y cols., 1997), así como en el estado de alerta, tiempo de reacción (Cysneiros y cols., 2007) y rendimiento físico (Doherty y Smith, 2004) son atribuidos al consumo moderado de metilxantinas y a su papel antagonista del receptor A_{2A} -adenosina.

2.4.5.3. Sistema Renal

Las altas excreciones urinarias atribuidas a CF y TP se deben a su papel como antagonistas del receptor A_1 -adenosina. Es por ello que estas metilxantinas se han usado como diuréticos en pacientes con insuficiencia cardíaca (Daly, 2007).

2.4.5.4. Sistema Respiratorio

Las metilxantinas han mostrado cierta actividad estimuladora de la respiración. Además, son conocidos ciertos efectos antitusivos de TB (Usmani y cols., 2005). CF y TP han sido usados en medicina como broncodilatadores de efecto moderado para tratar la apnea de bebés prematuros sin observar efectos adversos (Schmidt y cols., 2006). El uso terapéutico de TP para asmáticos deriva de sus funciones antagonistas del receptor A_{2B} -adenosina (Fozard y McCarthy, 2002).

2.4.5.5. Otros efectos fisiológicos

La CF ha mostrado un efecto positivo en Parkinson por activación del sistema dopaminérgico (Ross y cols., 2000) y también ha sido usada como analgésico. Igualmente, se ha sugerido un efecto preventivo en cáncer de piel asociado al consumo de metilxantinas presentes en té (Hakim y cols., 2000). Otros autores advierten de un menor riesgo de síndrome metabólico por obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (Ballard y cols., 2006); sin embargo, son aún escasos los datos al respecto.

Como consecuencia de los efectos saludables mostrados por las metilxantinas, en 2008 la Agencia Mundial Anti-Dopaje (World Anti-Dopping Agency, WADA) excluyó a la CF de la Lista Internacional de Sustancias Prohibidas ("Prohibited List-International Standards"). No obstante, es importante considerar un consumo moderado. Por ello, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) notificó que la ingesta de CF por día no debería exceder de 400 mg en adultos sanos, mientras que en mujeres embarazadas se debería limitar la ingesta a 200 mg y a 100 mg en adolescentes. Una sobredosis de CF tendría efectos adversos tales como ansiedad, taquicardia y temblores; sin embargo, estos efectos no han sido observados tras la ingesta de alimentos enriquecidos en metilxantinas, sino tras el consumo del compuesto puro (Reissig y cols., 2009).

2.5. Fuentes dietéticas de polifenoles, metilxantinas y fibra dietética

De los alimentos presentes en la dieta, dos tipos de productos han sido seleccionados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral: el cacao y el café. Estos alimentos, además de por su rica composición bioactiva en polifenoles, metilxantinas y fibra dietética, son de interés por su elevado consumo a nivel mundial. A continuación se detallarán las principales características de estas fuentes dietéticas.

2.5.1. Cacao

2.5.1.1. Generalidades sobre el cacao

La palabra cacao procede de los términos “cac” (rojo) y “cau” (fuerza) de la cultura maya, que ha cultivado este alimento desde hace más de 2500 años. Más tarde, los aztecas lo llamaron “cacahuatl”. El árbol del cacao, conocido como cacaotero o *Theobroma cacao* (*alimento de los dioses*, del griego Theo -dios- y broma -alimento-) era principalmente cultivado en América Central, aunque su producción se extendió posteriormente a África y Asia. Además de ser un alimento estimulante, las semillas de cacao también se utilizaban como moneda de cambio por los antiguos mayas. Aunque a Europa llegó después de la colonización de América, inicialmente su consumo estaba restringido sólo a la aristocracia. Las primeras tabletas de cacao fueron elaboradas por Cailler en 1820, y 20 años más tarde Rudolf Lindt elaboró tabletas de chocolate, a las que Henri Nestlé añadió un ingrediente, la leche, a principios del siglo XX.

Se conocen tres variedades de cacao:

- El criollo es el cacao de mayor calidad y aroma, por lo que se usa para elaborar el polvo de cacao con el que se fabrican los chocolates más finos. Representa aproximadamente el 10% de la producción mundial.
- El forastero o campesino, de menor valor económico, es el más cultivado. El grano de esta variedad, caracterizado como el menos aromático, debe ser intensamente tostado para neutralizar su sabor.

- El híbrido, y más concretamente el trinitario, es un cruce entre el criollo y el forastero, caracterizado por la robustez del cacao forastero y el delicado sabor del cacao criollo.

El cacao es la materia prima con la que se prepara el chocolate. Los granos de cacao son cuidadosamente tostados, proceso que le confiere el característico aroma, y posteriormente molidos y desengrasados para separar el polvo. El cacao en polvo es mezclado con manteca de cacao en distintas proporciones para obtener diferentes variedades de chocolate. Así, el chocolate negro contiene como mínimo un 50% de polvo de cacao, mientras que el chocolate con leche y el blanco contienen menos de un 40% y 20%, respectivamente.

2.5.1.2. Consumo

El cacao es conocido y consumido mundialmente. Según datos de la Organización Internacional del Cacao (ICCO), el nivel de producción de las cosechas ha decrecido en los últimos años; sin embargo, el consumo no ha dejado de crecer. En España, se consumen aproximadamente 4,7 g/persona/día de chocolate (Rusconi y Conti, 2010). Además, España es la mayor consumidora de productos de cacao en polvo, generalmente disueltos en leche, con una tasa de aproximadamente 1,7 kg/persona/año (Urpi-Sarda y cols., 2009).

2.5.1.3. Composición química

Hidratos de carbono, grasas, ácidos grasos saturados e insaturados, vitaminas, fibra y minerales son algunos de los principales nutrientes del cacao. La Tabla 5 compara la composición nutricional del cacao y algunos de sus productos derivados.

Diversos factores, incluyendo la variedad y el origen, influyen en la composición química y las propiedades organolépticas del cacao y sus productos derivados. El cacao en polvo, además de un menor porcentaje de grasa, contiene una mayor concentración polifenólica que la manteca de cacao (Visioli y cols., 2009) por lo que es generalmente usado para preparar otros productos derivados. Sin embargo, el procesado reduce su composición química bioactiva, y, por ello, el cacao en polvo tienen un mayor contenido en polifenoles que sus productos derivados, como el chocolate (Miller y cols., 2006).

El cacao es una importante fuente de fibra dietética, generalmente llamada fibra de cacao, que podría constituir un ingrediente funcional por su influyente papel en la

prevención de algunas enfermedades. La fibra de cacao se caracteriza por contener más del 60% en peso seco de FD, siendo mayoritaria la fracción insoluble con aproximadamente un 83% del total (Lecumberri y cols., 2006).

Tabla 5. Composición nutricional de cacao y productos derivados por cada 100 g de producto.

Contenido en 100 g	Cacao en polvo	Chocolate	Soluble de cacao
Energía (kcal)	255	449-534	360-375
Proteínas (g)	23	4,2-7,8	4-7
HC (g)	16	47-65	78-82
Azúcares (g)	3	50,1-60	70-78
Fibra (g)	23	5-9,9	7
Grasas (g)	11	29-30,6	2,5-3,5
AGS (g)	6,5	15,1-18,2	1,5-2,1
AGM (g)	3,6	8,1-10	0,8-1,1
AGP (g)	0,3	0,7-1,2	0,1
Sodio (g)	0,2	0,02-0,08	0,07-0,13
Calcio (mg)	150	35-63	30-300
Hierro (mg)	20	2,2-3,2	4-9
Magnesio (mg)	500	100-113	100-125
Vit A (UI)	3	3	1
Vit B1(mg)	0,37	0,04-0,07	0,07
Vit B6 (mg)	0,16	0,04-0,05	0,03
Ácido Fólico (mg)	38	6-10	7,6
Flavanoles totales (g)	3,4-5,2	0,08-0,81	0,74-1,18
Catequina (g)	0,06-0,09 ^d	0,02-0,21 ^c	0,02-0,04 ^d
Epicatequina (g)	0,16-0,26 ^d	0,03-0,27 ^c	0,02-0,04 ^d
Procianidinas (g)	3,2-4,8 ^d	0,03-0,33 ^c	0,7-1,1 ^d
Metilxantinas totales (g)	1,9-3,4	0,16-1,88	1,43
Teobromina (g)	1,6-2,7 ^a	0,15-1,64 ^b	1,3 ^c
Cafeína (g)	0,3-0,7 ^a	0,01-0,24 ^b	0,13 ^c
Teofilina	trazas	-	-

AGM: ácidos grasos mono-insaturados; AGP: ácidos grasos poli-insaturados; AGS: ácidos grasos saturados; HC: hidratos de carbono; Vit: vitamina. Los datos de macro y micronutrientes proceden de Rafecas y Codony (2000). Los datos de polifenoles y metilxantinas proceden de las siguientes fuentes: ^a Ramli y cols., (2001); ^b Langer y cols., (2011); ^c Llorach y cols., (2009); ^d Gu y cols., (2006).

El cacao es también reconocido como una importante fuente de antioxidantes por su alto contenido en flavonoides, principalmente flavan-3-oles y procianidinas, así como flavonoles (quercetina) y antocianinas. Un 12-18 % del peso seco de la semilla corresponde al contenido total de polifenoles (Grassi y cols., 2009), de los cuales procianidinas, catequinas y antocianinas son los mayoritarios con un 58, 37 y 4%, respectivamente, del total de polifenoles. Las principales procianidinas presentes en el cacao son las procianidinas B1 y B2, aunque también contiene procianidinas B3, B4, B5, C1 y D. El principal flavanol monomérico es (-)-epicatequina, con hasta un 35% del total de catequinas, junto con (+)-catequina, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina. Cianidin-3- α -L-arabinosa y cianidin-3- β -D-galactosa son las principales antocianinas del cacao. Otros derivados polifenólicos, tales como ácidos fenólicos, flavonas, flavanonas, estilbenos, fenoles simples e isocumarinas, también están presentes en el cacao (revisado en Khan y cols., 2014).

La presencia natural de metilxantinas en cacao es conocida desde la antigüedad. Las semillas de cacao contienen entre un 1 y 4% de TB y entre 0,2-0,5% de CF, mientras que la teofilina es encontrada en muy pequeñas concentraciones y sólo en algunas variedades (Koleva y cols., 2012). Los productos comerciales de cacao en polvo contienen aproximadamente un 1,9-2,6% de TB, 0,2-0,3% de CF y cantidades traza de TP (Apgar y Tarka, 1999).

2.5.1.4. Efectos fisiológicos e implicaciones en salud

Desde que Waterhouse y colaboradores (1996) sugirieron que el cacao podría ser considerado como una importante fuente de antioxidantes, numerosos estudios han sido llevados a cabo investigando los efectos saludables del cacao y los componentes responsables de tales beneficios, destacando el papel de los polifenoles, las metilxantinas y la fibra dietética. La Tabla 6 resume algunos de los estudios de intervención realizados hasta la fecha.

Tabla 6. Estudios en humanos de los efectos saludables del cacao y el chocolate.

	Sujetos (n)	Duración total	Intervención (g/d)	Resultados
Baba y cols. (2007a)	No aleatorizado, doble-ciego, paralelo. Sanos e hipercolesterolémicos (160)	4 semanas	Cacao (CAT=16,9-33,8, EC= 64,6-129, PB2= 36,3-72,5, CF= 130-133 mg/d)	↓ LDLox*, CT, LDL-C, TG ↑ HDL-C
Baba y cols. (2007b)	Aleatorizado, controlado. Sanos e hipercolesterolémicos (25)	12 semanas	Cacao (CAT= 35,1, EC= 98, PB2=41, CF= 122, TB= 41 mg/d)	↑ tiempo de oxidación de LDL*, CT y LDL-C y ↑ HDL-C*
Curtis y cols. (2012)	Aleatorizado, doble ciego, controlado. Mujer, diabetes y menopausia (93)	1 año	Chocolate (FI= 850, EC= 90 mg/d)	↓ Insulina*, LDL-C*, Resistencia a insulina*, glucosa
Davison y cols. (2008)	Aleatorizado, doble ciego, controlado, paralelo. Obesos y sobrepeso (49)	12 semanas	Cacao (FI= 902, TB= 673 mg/d) o placebo (FI= 36, TB= 654 mg/d)	↓ PAD*, resistencia a insulina*, PAS, FC, CT, HDL-C, LDL-C, TG
Fraga y cols. (2005)	Aleatorizado, cruzado. Sanos (28)	14 días	Chocolate con leche (FI= 168, CAT+EC=39, P=126 mg/d) o manteca de cacao (FI< 5mg/d)	↓CT*, LDL-C*, TG, MDA*, PAD*
Grassi y cols. (2005)	Aleatorizado, controlado. Sanos (15)	29 días	Chocolate negro (FI= 500 mg/d) o chocolate blanco	↓ PAS*, Resistencia a insulina*, ↑ sensibilidad a insulina*
Grassi y cols. (2008)	Aleatorizado, ciego, cruzado. Hipertensos (19)	29 días	Chocolate negro (FI= 1008, CAT= 36,12, EC= 110,9 mg/d) o chocolate blanco (FI= 130, EC= 0,04 mg/d)	↓ PA*, LDL-C*, CT*, resistencia a insulina* y ↑ sensibilidad a insulina*
Heiss y cols. (2010)	Aleatorizado, doble ciego, controlado. Enfermos coronarios (20)	30 días	Cacao rico en flavanoles (FI= 750 mg/d) o placebo (FI= 18 mg/d)	↓ PA* y ↑ Nitrito en plasma*
Hermann y cols. (2006)	Aleatorizado, paralelo. Fumadores (25)	Agudo (1 día)	Chocolate negro (74% de cacao) o chocolate blanco (4% de cacao)	↓ Agregación plaquetaria*
Khan y cols. (2012)	Aleatorizado, cruzado, controlado. Sujetos en riesgo cardiovascular (42)	10 semanas	Cacao (CAT= 10,41, EC= 46,08, PB2=36,54 mg/d)	↓LDL-ox*, PAD, CT, TG, LDL-C y ↑ HDL-C*
Mathur y cols. (2002)	Sanos (25)	12 semanas	Chocolate (PB= 169, CF= 26, TB= 170 mg/d) y Cacao (CF= 34, TB= 408, PB= 482 mg/d)	↑ tiempo de oxidación de LDL*, TG
Mellor y cols. (2010)	Aleatorizado, doble ciego, cruzado, controlado. Diabéticos (12)	16 semanas	Chocolate negro (EC= 16,6 mg/d) y placebo (EC< 2 mg/d)	↓ TG, LDL-C, PCR y ↑ HDL-C*

Monagas y cols. (2009)	Aleatorizado, cruzado, controlado. Sujetos en riesgo cardiovascular (42)	10 semanas	Cacao (FI= 495, CAT= 10,4, EC= 46,1, PB2= 36,5, TB= 440 mg/d)	↓ sICAM-1*, PAD, CT, TG, LDL-C, sVCAM-1, MCP-1, PCR ↑ HDL-C*
Muniyappa y cols. (2008)	Aleatorizado, doble-ciego, cruzado, controlado. Hipertensos (20)	4 semanas	Cacao enriquecido (FI= 900 mg/d)	↓ PA
Murphy y cols. (2003)	Aleatorizado, doble-ciego, controlado. Sanos (32)	28 días	Cacao enriquecido (FI= 234 mg/d) o placebo (6 mg/d)	↓ Agregación plaquetaria* (inducida por colágeno y ADP), P-selectina*
Njike y cols. (2011)	Aleatorizado, doble-ciego, cruzado, controlado. Sobrepeso (44)	8 semanas	Cacao con o sin azúcar (FI= 805, CAT= 21, EC=48, PB2= 190, TB= 436, CF= 28 mg/d) o placebo	IMC estable
Sarriá y cols. (2012)	No aleatorizado, ciego, no controlado. Hipercolesterolémicos (21)	8 semanas	Cacao (FD= 12 g/d, PF= 283 mg/d)	↓ Glucosa*, PAS*, PAS*, MDA* ↑ HDL-C
Sorond y cols. (2008)	Aleatorizado, doble-ciego, paralelo, controlado. Sanos (34)	1 semana	Cacao enriquecido (FI= 900, CF= 36,6, TB= 673 mg/d) o placebo (FI= 36, CF= 42,4, TB= 652 mg/d)	↑ Flujo sangre cerebral
Stote y cols. (2012)	Aleatorizado, doble ciego, cruzado. Obesos (37)	5 días	Cuatro cacaos (FI= 30-900, CAT= 4-52, EC= 4-184, CF= 33-38, TB= 591-608 mg/d)	↓ IL-6*, PCR*
Taubert y cols. (2007)	Aleatorizado, ciego, paralelo, controlado. Pre-hipertensos (44)	18 semanas	Chocolate negro (CAT= 1,7, EC= 5,1, CF= 3,1, TB= 26,4 mg/d) o blanco	↓ PA*
Tzounis y cols. (2011)	Aleatorizado, doble-ciego, cruzado, controlado. Sanos (22)	12 semanas	Cacao enriquecido (FI= 494 mg/d) o placebo (FI= 23 mg/d)	↓ TG*, PCR*, CT*, LDL-C, PA
Wang y cols. (2006)	Aleatorizado, doble-ciego, cruzado, controlado. Menopáusicas e hipertensas (32)	6 semanas	Cacao enriquecido (FI= 446 mg) o placebo (FI= 43 mg)	↓ sVCAM-1*, E-selectina

ADP: adenosín difosfato; CAT: catequina; CF: cafeína; CT: colesterol total; EC: epicatequina; E-selectina: selectina endotelial; FC: frecuencia cardiaca; FD: fibra dietética; FI: flavanoles; HDL-C: lipoproteína de alta densidad; IL: interleuquina; IMC: índice de masa corporal; LDL-C: lipoproteína de baja densidad; LDL-ox: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1; MDA: malondialdehído; NF-κB: factor nuclear kappa B; PA: presión arterial; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica; PB2: procianidina B2; PCR: proteína C reactiva; PF: polifenoles; P-selectina: selectina plaquetaria; sICAM-1: molécula de adhesión intercelular soluble-1; sVCAM-1: molécula de adhesión vascular soluble-1; TB: teobromina; TG: triglicéridos. *= cambios significativos (p< 0,05).

2.5.1.4.1. Salud Cardiovascular

Aunque numerosas evidencias han encontrado una asociación entre la salud cardiovascular y el consumo de cacao (Hertog y cols., 1995; Corti y cols., 2009; Hooper y cols., 2012), este aspecto debe ser analizado críticamente y, por ello, los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos del cacao aún siguen siendo investigados en la actualidad. Los efectos fisiológicos del cacao y el chocolate sobre la lipemia, antioxidación de LDL, función endotelial, presión sanguínea, inflamación y función antiplaquetaria, así como los mecanismos moleculares responsables de tales efectos han sido previamente revisados (Ding y cols., 2006; Galleano y cols., 2009; Andújar y cols., 2012; Arranz y cols., 2013).

➤ Función endotelial

Una dieta rica en flavonoides ha mostrado causar elevados niveles urinarios de metabolitos nitrosilados, que sugieren un aumento en la producción de NO (Andújar y cols., 2012). Las enzimas eNOS y arginasa compiten por L-Arginina; sin embargo, la adición de flavanoles a células endoteliales reduce la actividad de arginasa, favoreciendo así la síntesis de NO mediada por eNOS y la correcta vasodilatación (Corti y cols., 2009).

La mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la fecha, recientemente revisados por Ellam y Williamson (2013), muestran mejoras en la función endotelial como consecuencia del consumo de cacao o productos derivados. Tras el consumo de cacao con una elevada composición en flavanoles (750 mg/d), Heiss y colaboradores (2010) observaron mayores niveles plasmáticos de nitrito que explicaban la mayor biodisponibilidad de NO en pacientes con riesgo cardiovascular. Además, los efectos beneficiosos en la función endotelial, generalmente medidos por dilatación mediada por flujo (FMD), son observados a nivel postprandial, así como tras el consumo crónico (Hooper y cols., 2008). La epicatequina (EC) parece reproducir los mismos efectos vasculares que el cacao al reducir los niveles plasmáticos del vasoconstrictor endotelina-1 y disminuir la expresión de arginasa (Loke y cols., 2008), mientras que la CF activa la expresión de la eNOS (Echeverri y cols., 2010), por lo que ambos componentes podrían ser responsables de la mayor producción endotelial de NO, y el consumo de cacao podría ofrecer un efecto protector a nivel vascular.

➤ Función plaquetaria

Mantener la integridad vascular para así evitar la agregación plaquetaria es un mecanismo protector frente al desarrollo de aterosclerosis y trombosis (Ellam y Williamson,

2013). Una elevada concentración de NO en las células endoteliales no sólo es beneficiosa para la vasodilatación, sino que además contribuye a inhibir la agregación plaquetaria. Los flavan-3-oles del cacao podrían reducir la expresión de la conformación activa de glicoproteínas IIb/IIIa impidiendo, por tanto, su adhesión a la superficie de las proteínas (Corti y cols., 2009). La menor función plaquetaria tras el consumo prolongado de cacao en sujetos sanos sugería que los polifenoles inhiben la agregación plaquetaria a la pared endotelial (Murphy y cols., 2003; Hermann y cols., 2006), aunque aquellos sujetos que han sufrido un evento coronario también reducen la adhesión postprandial de plaquetas al consumir un producto de chocolate rico en flavanoles (Flammer y cols., 2007). Curiosamente, en estos estudios las mejoras en la función plaquetaria fueron acompañadas de un incremento en los niveles plasmáticos de catequina y EC, pudiendo ser estos dos componentes bioactivos del cacao los responsables de la menor adherencia. Recientemente, Camevale y colaboradores (2012) han observado un efecto similar en sujetos fumadores, en quienes se inhibía la función plaquetaria tras consumir chocolate con un 85% de cacao.

La mayoría de estos estudios asociaban las propiedades antioxidantes del cacao con una mayor disponibilidad endotelial de NO, que inhibe la síntesis celular de eicosanoides, y más concretamente de leucotrienos, caracterizados por sus propiedades vasoconstrictoras (revisado en Arranz y cols., 2013). Se ha observado que una elevada proporción de procianidinas en el chocolate reduce la síntesis de leucotrienos en un 29% (Schramm y cols., 2001).

➤ Lipemia

Los mecanismos implicados en la regulación del colesterol sérico son tan diversos que podrían actuar de forma sinérgica. La mayor expresión de proteínas SREBPs, implicadas en la biosíntesis y metabolismo del colesterol, así como de receptores de LDL, serían responsables de un incremento en la secreción de apoproteína Apo-A1 y un descenso de la Apo-B. Como consecuencia de estos procesos, mayores niveles de HDL-C y menores niveles de LDL-C han sido observados tanto en células hepáticas como intestinales tratadas con polifenoles del cacao puros (Yasuda y cols., 2011).

La regulación de los lípidos séricos en humanos tras el consumo de cacao o chocolate ha dado lugar a controversias; sin embargo, las diferencias podrían estar asociadas a diversos factores, tales como la dosis de polifenoles, la composición del cacao o el tiempo de intervención (Arranz y cols., 2013). Algunos autores han observado efectos neutros (Mursu y cols., 2004), lo que discrepa de la mayoría de estudios que describen un efecto hipolipemiante de los flavanoles del cacao y del chocolate en humanos (Baba y cols., 2007b; Fraga y cols., 2005; Grassi y cols., 2008). Los diversos estudios de intervención llevados a

cabo hasta la fecha con cacao o productos derivados han confirmado un descenso en los niveles séricos de LDL-C (Grassi y cols., 2008), así como un incremento significativo en los niveles de HDL-C (Monagas y cols., 2009). Estos efectos han sido observados en sujetos sanos que reducían tanto el CT como el LDL-C en sangre tras 14 días consumiendo un producto de chocolate con leche (Fraga y cols., 2005) y en pacientes ligeramente hiperlipémicos, quienes tenían mayores concentraciones de HDL-C tras un consumo regular durante 4 semanas de un producto de cacao en polvo soluble (Khan y cols., 2012). Estos efectos también se observan en sujetos con otras patologías y enfermedades relacionadas con la salud cardiovascular. Así, un grupo de sujetos diabéticos mostraban mayores niveles séricos de HDL-C tras 8 semanas consumiendo un producto de chocolate (Mellor y cols., 2010), mientras que las mujeres diabéticas y menopáusicas que consumieron chocolate rico en flavonoides durante 1 año reducían sus niveles de LDL-C (Curtis y cols., 2012).

Por otro lado, no todos los beneficios cardiovasculares del cacao se asocian a su composición polifenólica. El consumo de FS también contribuye a reducir los niveles de CT y LDL-C, mientras que la FI dificulta la absorción de grasas de la dieta (Ruiz-Roso y cols., 2010). No obstante, los estudios evaluando una elevada ingesta de FD con cacao son muy escasos. Un grupo de sujetos hipercolesterolémicos tendían a reducir sus niveles de HDL-C sin mostrar cambios en otros parámetros lipídicos cuando consumieron durante 8 semanas un cacao que aportaba 12 g diarios de FD, compuesta mayoritariamente de FI (Sarriá y cols., 2012). La mayor síntesis y excreción de ácidos biliares, la inhibición de la síntesis de colesterol y el incremento en la síntesis hepática de receptores de lipoproteínas LDL podrían ser los principales responsables de los efectos hipolipémicos por parte de la FD.

Como consecuencia del consumo prolongado de cacao y productos derivados, muchos autores mostraron también un descenso en los niveles sanguíneos de TG en pacientes sanos (Tzounis y cols., 2011), aunque los sujetos hipertensos (Baba y cols., 2007a) y aquellos que presentan varias patologías asociadas al riesgo cardiovascular (Monagas y cols., 2009) también tienden a esta mejora lipémica. La absorción intestinal de TG y, por tanto, la reducción en los niveles sanguíneos de LDL-C podría deberse a la inhibición de lipasa pancreática así como una mayor actividad de lipoprotein lipasa (Lecumberri y cols., 2007). El carácter preventivo de los marcadores lipémicos influye además en otros factores cardiovasculares como la regulación de la PA y el control de patologías asociadas a la obesidad y la diabetes, tal y como se observó en los estudios de Davison (Davison y cols., 2008) y Mellor (Mellor y cols., 2010) con pacientes obesos y diabéticos, respectivamente.

Otro biomarcador de riesgo cardiovascular es la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL-ox). Tras el consumo de cacao enriquecido en flavanoles (178 mg/d), el tiempo requerido para la oxidación de las LDL se incrementa (Baba y cols., 2007b) y, como consecuencia, los sujetos con un elevado riesgo cardiovascular reducían sus niveles plasmáticos de LDL-ox tras el consumo regular de 93 mg de flavanoles en un producto

soluble de cacao (Khan y cols., 2012). El polvo de cacao sería capaz de inhibir este proceso oxidativo, apuntando a la catequina pura como el mayor responsable de tal efecto al evitar la oxidación de LDL en un 87%, mientras que la ingesta de flavanoles en el cacao reducía la oxidación en un 75% (Waterhouse y cols., 1996). Por otro lado, no se puede descartar la implicación de las metilxantinas, dado que la CF también parece tener un efecto inhibidor de la peroxidación de las LDL (Lee, 2000).

➤ Presión arterial

Una reducción de 3 mm Hg en la presión sanguínea sería suficiente para reducir el riesgo cardiovascular asociado a la hipertensión. Varios meta-análisis revisados por Cherniack (2011) han evaluado el efecto del consumo de cacao en la tensión arterial, observando reducciones de 4,5 y 2,5 mm Hg en la presión sistólica y diastólica, respectivamente. Este hecho ha sido evidenciado tanto en sujetos normotensos (Heiss y cols., 2010; Sarriá y cols., 2012) como hipertensos (Muniyappa y cols., 2008; Grassi y cols., 2008; Desch y cols., 2010). Además, un grupo de sujetos que habían sufrido un evento coronario reducían su PA sistólica en 4,2 mm Hg cuando consumían un cacao que aportaba 750 mg diarios de flavanoles a diferencia del grupo control que ingirió únicamente 18 mg diarios de flavanoles (Heiss y cols., 2010). Por ello, algunos autores sugieren la inclusión de cantidades moderadas de cacao y chocolate en la dieta como medida preventiva para reducir o retrasar la hipertensión arterial (Grassi y cols., 2005c). Sin embargo, una saturación en la dosis de polifenoles podría inducir la ausencia de cambios en la PA, tal y como observaron Almoosawi y colaboradores (2010) al incrementar la ingesta diaria de polifenoles de 500 a 1000 mg. Aunque los efectos del cacao en hipertensión han sido asociados a los flavonoides, no se puede descartar la implicación de otros componentes bioactivos de este alimento. Así, la TB también provoca una reducción en la presión sanguínea sistólica central (Van den Bogaard y cols., 2010), mientras que la presencia natural de magnesio en el cacao contribuiría a su efecto hipotensivo (Steinberg y cols., 2003).

Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que los mayores niveles de NO asociados al consumo crónico de flavanoles del cacao podrían ser los principales responsables de la menor tensión arterial. Persson y colaboradores (2011) observaron que el consumo de chocolate negro conteniendo un 72% de cacao inhibe el enzima convertidor de angiotensina a nivel postprandial, evitando así su conocido efecto vasoconstrictor, mientras que por otro lado las metilxantinas estimulan la expresión de eNOS mediada por calcio (Echeverri y cols., 2010). Por ello, los productos de cacao podrían considerarse un alimento cardiosaludable.

Como consecuencia de los beneficios observados en los estudios de intervención con cacao y chocolate, la EFSA aprobó en Julio de 2012 una alegación sobre la relación causa-efecto entre la ingesta de 200 mg de flavanoles de cacao y el mantenimiento de la vasodilatación dependiente del endotelio, aceptando así la inclusión de cacao y chocolate en el contexto de dieta equilibrada. Tales cantidades podrían ser proporcionadas por 2,5 g de cacao en polvo o 10 g de chocolate negro (Arranz y cols., 2013). Sin embargo, el contenido en grasas y azúcares de gran parte de los productos de cacao y chocolate debería tenerse en cuenta en el contexto de una dieta equilibrada, razón por la cual nuevos productos bajos en calorías están siendo fabricados.

2.5.1.4.2. Inflamación

La mayoría de los mecanismos implicados en el desarrollo de ciertas enfermedades tienen un componente inflamatorio pero la cuestión no sólo radica en los mecanismos de actuación, sino también en cuáles son los ingredientes nutricionales responsables de activar o inactivar tales mecanismos. Estudios llevados a cabo tanto con chocolate como con cacao en polvo han mostrado un efecto anti-inflamatorio (Monagas y cols., 2009; Nogueira y cols., 2012). Además, estos resultados se mantienen con la ingesta elevada de flavanoles, aludiendo los efectos beneficiosos del cacao a nivel de inflamación a este grupo de polifenoles y descartando la implicación de otros ingredientes (Wang-Polagruto y cols., 2006).

Los menores niveles de PCR tras consumir diferentes dosis de cacao no sólo confirman el efecto protector de este alimento, sino que además evidencian el papel de los polifenoles en esta respuesta. Un grupo de sujetos obesos e hipertensos reducían sus niveles de PCR tras 4 semanas consumiendo más de 2 g diarios de polifenoles con un producto de cacao (Nogueira y cols., 2012), aunque algunos autores sólo han confirmado estos efectos del cacao en sujetos sanos tras un mes ingiriendo diariamente casi 500 mg de flavanoles (Tzounis y cols., 2011). Un efecto dosis-respuesta podría asociarse a la cantidad de flavanoles ingeridos, ya que con forme se incrementaba la cantidad de flavanoles desde 30 a 900 mg diarios, los niveles postprandiales de PCR disminuían en un grupo de sujetos obesos (Stote y cols., 2012).

Mientras otros autores no han podido asociar un efecto anti-inflamatorio al cacao (Mathur y cols., 2002), su consumo ha mostrado una tendencia a reducir los niveles plasmáticos de IL-6 (Nogueira y cols., 2012; Stote y cols., 2012). Para asignar tales efectos a los componentes polifenólicos del cacao, se evaluó *in vitro* la inhibición de los biomarcadores MCP-1 y TNF- α por flavonoles puros (epicatequina e isoquercetina), siendo la respuesta de isoquercetina mayor para ambas citoquinas (Ramiro y cols., 2005). Además, se ha observado una asociación inversa entre la ingesta de FD y la secreción de citoquinas

pro-inflamatorias de activación general (IL-6 y TNF- α) (Ma y cols., 2008), por lo que, teniendo en cuenta el contenido natural de FD y de flavanoles en los productos de cacao, cabría esperar una respuesta anti-inflamatoria tras el consumo de estos productos.

Los procesos inflamatorios promueven también la disfunción endotelial. La elevada producción de moléculas solubles de adhesión sICAM-1 y sVCAM-1, así como otras moléculas de adhesión endotelial (E-selectina) y plaquetaria (P-selectina), favorecen el reclutamiento de monocitos y otros componentes celulares implicados en la aterogénesis. El consumo regular de más de 200 mg diarios de flavanoles no sólo influye beneficiosamente en sujetos sanos, quienes reducen sus niveles de P-selectina (Murphy y cols., 2003), sino también en mujeres menopáusicas que reducen los niveles de sVCAM-1 (Wang-Polagruto y cols., 2006) y en sujetos en riesgo cardiovascular que atenúan la activación de sICAM-1 y tienden a reducir la concentración plasmática de otros biomarcadores de inflamación (PCR, MCP-1) como consecuencia de una menor activación del factor NF- κ B (Monagas y cols., 2009).

2.5.1.4.3. Obesidad y Diabetes

Aunque los estudios sobre el efecto del cacao en pacientes diabéticos son escasos, hasta la fecha es bien conocido que los polifenoles atenúan la respuesta glicémica postprandial y la hiperglicemia, al mismo tiempo que mejoran la sensibilidad a insulina y su secreción. Grassi y colaboradores (2005a, 2005c, 2008) mostraron un aumento significativo en la sensibilidad a insulina junto a una menor resistencia a insulina tanto en pacientes sanos como hipertensos, con o sin baja tolerancia a glucosa, consumiendo 100 g diarios de chocolate negro. Estos resultados fueron posteriormente confirmados en mujeres menopáusicas (Curtis y cols., 2012) que, tras 1 año consumiendo chocolate con un aporte diario de 850 mg de flavanoles totales, reducían además la secreción de insulina, así como los niveles de glucosa; sin embargo, la composición en flavan-3-oles e isoflavonas del producto no permitía discernir entre los componentes fenólicos responsables de tal efecto hipoglicémico.

El contenido en azúcar de los productos de cacao y derivados no sólo podría afectar a la absorción de glucosa, sino que podría además inducir una ganancia de peso. Teniendo en cuenta que más del 80% de los pacientes diabéticos son obesos, Davison y colaboradores (2008) llevaron a cabo un estudio en un grupo de sujetos obesos observando una menor resistencia a insulina al consumir un cacao enriquecido en flavanoles. El efecto de la glucosa del cacao parece contrarrestarse con el conocido papel hipoglicémico de los polifenoles, observado tras consumir dos productos de cacao con y sin azúcar, sin inducir cambios en el IMC (Njike y cols., 2011). Sin embargo, el efecto hipoglucémico se perdería consumiendo más de 500 mg diarios de flavonoides (Shrime y cols., 2011), razón que explicaría por qué

Muniyappa y colaboradores (2008) no observaron cambios en sujetos hipertensos tras consumir 900 mg diarios de flavanoles. Un meta-análisis de 42 estudios llevado a cabo por Hooper y colaboradores (2012) concluye que la reducción de los niveles circulantes de glucosa en sangre se pierde cuando la dosis de EC supera los 100 mg diarios. Además, aunque los efectos parecen ser únicamente observados en estudios de máximo 3 semanas de duración, Nogueira y colaboradores (2012) observaron una reducción en los niveles circulantes de glucosa tras 4 semanas consumiendo un producto de chocolate.

La inhibición de la digestión de carbohidratos y de la absorción intestinal de glucosa, así como la mejora en la secreción de insulina en las células β pancreáticas y la activación de receptores de insulina en los tejidos donde se absorbe la glucosa son algunos de los mecanismos que explicarían los resultados mediados por los polifenoles y el menor riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (revisado en Andújar y cols., 2012). Junto al efecto protector de los polifenoles, la FD también es un potente inhibidor de la absorción de glucosa a nivel intestinal (Giacco y cols., 2000), hecho que justifica el menor riesgo de diabetes asociado al consumo de cacao o chocolate conteniendo fibra de forma natural. Así, en un modelo de sujetos hipercolesterolémicos, la ingesta regular de un producto de cacao rico en FD produjo un descenso en los niveles de glucosa en ayunas (Sarriá y cols., 2012). Aunque una dieta enriquecida en fibra de cacao soluble también parece mejorar la resistencia a insulina (Sánchez y cols., 2010). Además, el magnesio presente en el cacao influye en la modulación de hormonas como la insulina, contribuyendo así a una mejora en la absorción tisular de glucosa mediada por insulina y reduciendo, por tanto, el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Barbagallo y cols., 2003).

El cacao, por ser un alimento calórico (500 kcal/100 g en el caso del chocolate, Tabla 5), podría contribuir a un aumento del peso corporal; sin embargo, su incorporación a la dieta diaria no parece inducir una ganancia de peso a corto plazo (Njike y cols., 2011). La conocida contribución de la CF a la pérdida de peso (López-García y cols., 2006a) se asocia a la lipólisis inducida por un incremento en los niveles de catecolaminas. De entre los polifenoles, las procianidinas son los principales componentes inhibidores de la absorción intestinal del colesterol y las sales biliares, al mismo tiempo que inhibirían la acumulación de lípidos, induciendo así un efecto hipocolesterolémico (Yasuda y cols., 2008). Además, el efecto termogénico de los polifenoles y su capacidad para disminuir la lipogénesis y adipogénesis también tendría un papel importante en el mantenimiento del peso corporal (Ali y cols., 2014).

2.5.1.4.4. Sistema Nervioso Central

El cacao se caracteriza por ser un alimento psicoactivo. La feniletilamina formada durante el tostado de las semillas de cacao es uno de los principales componentes psicoactivos, encontrando aproximadamente 0,66 mg/100 g de cacao (Smit, 2011). Este componente es capaz de activar los neurotransmisores del cerebro; sin embargo, sus efectos son muy débiles al ser rápidamente eliminado del organismo, por lo que las propiedades estimulantes del cacao y productos derivados deben asociarse a sus otros componentes psicoactivos, tales como las metilxantinas TB y CF. Además, aunque la concentración de estos alcaloides en el cacao sea muy diferente dependiendo del origen, la variedad, etc., algunos autores apuntan que los efectos psicofarmacológicos podrían deberse a la sinergia de ambas metilxantinas (Smit y cols., 2004; Mitchell y cols., 2011).

Una mejora en diversos factores que influyen en la función cognitiva ha sido revisada y descrita por Ellam y Williamson (2013), destacando un aumento del flujo sanguíneo cerebral y un descenso en la fatiga. Los efectos a nivel neuronal parecen afectar tanto a jóvenes como a adultos. Así, mientras un grupo de adultos sanos, con una edad media de 72 años, mejoraba el flujo sanguíneo a nivel cerebral tras 1 semana consumiendo 900 mg de flavanoles con un producto de cacao (Sorond y cols., 2008), un grupo de sujetos jóvenes y sanos aumentaba la capacidad de atención y reducía la fatiga postprandial tras la ingesta aguda de 520 y/o 940 mg de cacao (Scholey y cols., 2010).

Por otro lado, los efectos del cacao apuntan también a la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Así, Cimini y colaboradores (2013) han observado recientemente que el cacao podría afectar, directa o indirectamente, a las rutas de señalización neuronal implicadas en enfermedades con un componente oxidativo, como es el caso del Alzheimer.

2.5.1.4.5. Cáncer

Aunque los mecanismos de acción del cacao en cáncer aún no han sido bien clarificados, los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que los componentes bioactivos del cacao podrían contribuir a un efecto anti-cancerígeno. El daño oxidativo al ácido desoxirribonucleico (DNA) parece ser inhibido en células HepG2 sometidas a estrés oxidativo y tratadas con un extracto de cacao por acción de los polifenoles, tal y como demostraron Martín y colaboradores (2008). Estos mismos autores han sugerido recientemente que tales efectos podrían ser debidos a la ya conocida capacidad antioxidante de los polifenoles y a su papel en la regulación de las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular, apoptosis y metástasis (Martin y cols., 2013). Mientras que un extracto de procianidina inhibe en un 70% el crecimiento de células

humanas de cáncer de colon, las metilxantinas TB y CF, por su papel antagonista del receptor de adenosina, inhiben la angiogénesis inducida en diferentes tipos de células cancerígenas de ovario y colon, entre otras (revisado en Kim y cols., 2013). Por ello, tanto los flavonoides como las metilxantinas presentes en el cacao podrían contribuir a los efectos antiproliferativos, antimutagénicos y quimioprotectores (Okano y cols., 2008), sin descartar la contribución de la FD a la prevención del desarrollo de cáncer colorrectal (Dahm y cols., 2010).

2.5.2. Café

2.5.2.1. Generalidades sobre el café

El descubrimiento del café parte de una leyenda sobre un pastor de Arabia, el cual observó cómo sus cabras parecían más contentas y activas después de haber comido la cereza del café. El terminó café proviene de Kaffa, la región de Etiopia donde se probó por vez primera, y hace referencia a las semillas sanas y limpias procedentes de las diversas especies del género botánico *Coffea sp* (cafeto), cuyo fruto, conocido como cereza, contiene las semillas que serán posteriormente procesadas, tostadas y molidas para su consumo.

El cafeto se cultiva principalmente en zonas tropicales de América del Sur, siendo Brasil y Colombia los mayores productores a nivel mundial. Las variedades más comunes son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (comúnmente conocida como Robusta), originarias de Etiopia y Zaire, respectivamente. Desde su descubrimiento se ha conocido una gran variedad de granos, aromas, sabores, composición, e incluso formas de consumo: mezcla, natural, descafeinado, torrefacto, instantáneo o soluble (Bravo-Clemente y cols., 2010). Sin embargo, en los últimos años, nuevas formulaciones de café están siendo comercializadas como mezclas de café tostado y verde, extractos concentrados de café verde, etc.

2.5.2.2. Consumo

El aroma del café es único e inconfundible. Millones de tazas de café son consumidas a diario en todo el mundo por jóvenes, adultos y ancianos a cualquier hora del día. El café puede ser consumido sólo o combinado, ya que admite la adición de muchos otros ingredientes como edulcorantes, leche, licor, chocolate, etc.

La Organización Internacional de Café (www.ico.org) evaluó el consumo per cápita, siendo Suiza y los países escandinavos los mayores consumidores de café con una media de 6 kg/persona en 2011, mientras que el consumo en España fue de 4,2 kg/persona. El consumo mundial de café creció un 2,1% de 2011 a 2012, y en particular un 9,1% en España.

2.5.2.3. Composición química

Desde un punto de vista nutricional, el café es una bebida saludable por su bajo contenido en ácidos grasos y calorías; sin embargo, la adición de ingredientes como azúcar, leche o crema incrementa su valor energético.

El café es una de las mayores fuentes de antioxidantes de la dieta por su elevado contenido polifenólico, junto a otros componentes bioactivos tales como metilxantinas, FD, diterpenoides y minerales (magnesio y potasio). La influencia geográfica y ambiental, así como el procesado de los granos son algunos de los factores influyentes en la composición química del café, siendo de gran importancia el tueste del grano. El fuerte impacto térmico del tostado (200°C) no sólo puede llegar a reducir el contenido de polifenoles en más de un 50% y, por tanto, la capacidad antioxidante del café (Alonso-Salces y cols., 2009), sino que además genera otros antioxidantes menos activos como sub-productos de la reacción de Maillard con propiedades beneficiosas (melanoidinas) (Morales y cols., 2012), al mismo tiempo que produce otros compuestos perjudiciales (hidroxihidroquinonas) (Yamaguchi y cols., 2008) para la salud. Reducir el tostado evita las alteraciones en la composición, por lo que el café verde conserva una mayor concentración de los componentes bioactivos en comparación con el café tostado (Schenker y cols., 2002).

Se han identificado hasta 44 compuestos fenólicos en semillas de café de las variedades Arábica y Robusta, siendo mayoritarios los derivados de los ácidos hidroxicinámicos, principalmente ácidos cafeoilquínicos (CQA), dicafeoilquínicos (diCQA) y feruloilquínicos (FQA), aunque los ácidos cinámicos simples (cafeico, CA, y ferúlico, FA), así como sus amidas, glicósidos e hidroxicinamatos también han sido identificados (Alonso-Salces y cols., 2009). La concentración total de estos compuestos en la semilla verde de la variedad Robusta (88 mg/g) supera a la variedad Arábica (68,8 mg/g) (Fujioka y Shibamoto, 2008). El ácido dorogénico o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) es el fenol mayoritario en el café representando casi un 50% del total de derivados hidroxicinámicos (Mullen y cols., 2011) y llegando a alcanzar 14,3 o 41 mg por taza de café tostado o café verde, respectivamente (Mills y cols., 2013).

La CF es la principal metilxantina naturalmente presente en café (771,4 µg/mL), junto a concentraciones minoritarias de TB (11,50 µg/mL) y TP (<0,06 µg/mL) (De Aragao y cols.,

2005), aunque esta composición depende de diversos factores: el contenido de CF en las semillas de café verde es de entre 1-1,6% del peso seco en la variedad Arábica, mientras que en las semillas de café verde de la variedad Robusta pueden alcanzar concentraciones de 1,5-3,3% de peso seco (Ky y cols., 2001). El café descafeinado contiene menos de 0,5 mg/g de CF, en comparación con el cafeinado donde varía entre 5,2 y 12,2 mg/g (Hackett y cols., 2008).

Aparte del contenido en polifenoles y metilxantinas, aproximadamente un 2,5% de la materia seca está constituida por potasio (Higdon y Frei, 2006) y un 0,6% por los diterpenoides alcohólicos cafestol y kahweol, que contribuyen al característico aroma del café (Bonita y cols., 2007). Otros componentes minoritarios en el café son el magnesio, entre 1-6 mg/100 g de café, (Chu, 2012), la vitamina B3 y el potasio (Spiller, 1998). Además, el café podría considerarse una fuente de FD con contenidos de 2,5% en café filtrado y 3,1% en café expreso (Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2007).

Debido a las variedades de granos de café y a la influencia del procesado en su composición, el café puede proporcionar cantidades muy variadas de componentes bioactivos. Una taza de 200 mL de café tostado contiene entre 15 y 325 mg de derivados hidroxycinámicos (Mills y cols., 2013) y entre 60 y 85 mg de CF (Crozier y cols., 2011). Atendiendo al contenido en diterpenos, una taza de 200 mL de café hervido presenta entre 0,2 y 5,2 mg, mientras que el contenido se reduce a 0,2 mg en el café filtrado (Ranheim y Halvorsen, 2005).

2.5.2.4. Efectos en salud

La mayoría de los estudios de cohorte prospectivos no han observado que el consumo de café esté significativamente asociado con un mayor riesgo cardiovascular o de infarto (Higdon y Frei, 2006). Sin embargo, estudios controlados aleatorizados de hasta 12 semanas han descrito que el consumo de café está asociado con el incremento de factores de riesgo cardiovascular como el incremento de tensión (James, 2004) y los niveles de homocisteína. La enfermedad cardiovascular, diabetes y obesidad están relacionadas con un incremento de ROS, con el consiguiente daño oxidativo a macromoléculas tales como el ADN, lípidos y proteínas. Muchos de los efectos beneficiosos en salud del café se han atribuido al efecto antioxidante de su fracción fenólica; no obstante, estos compuestos también pueden mediar otros efectos beneficiosos sobre distintas funciones fisiológicas, resultando en la disminución del riesgo de diversas patologías. Asimismo, otros componentes bioactivos presentes en el café pueden participar en la protección frente a la diabetes tipo 2, cirrosis hepática, diversos tipos de cáncer y de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Shi y cols., 1991; Cavin y cols., 2002; Higdon y Frei, 2006; Bonita y cols., 2007; Lee y cols., 2007), como las metilxantinas y sus derivados metilúricos, que ya han demostrado contribuir en la

capacidad antioxidante del café (Natella y cols., 2002), junto las melanoidinas formadas en la reacción de Maillard durante el tostado de este alimento (Morales y cols., 2012). A continuación se resumen los más importantes efectos biológicos del café en salud humana, recogándose en la Tabla 7 los estudios de intervención con café más relevantes.

Tabla 7. Estudios en humanos de los efectos en salud del café.

	Estudios de intervención agudos			
	Diseño del estudio (n)	Duración total	Tratamiento y composición (cantidad)	Resultados
Corti y cols. (2002)	Ciego. Sanos (15)	4 días	Café, café descafeinado y CF pura (250 mg)	↑ PA en consumidores no habituales
Gavrieli y cols. (2011)	Aleatorizado, cruzado. Sanos (16)	3 días	Café (3mg/kg de peso)	IL-6 y adiponectina no varían
Karatzis y cols. (2005)	Aleatorizado, doble ciego, cruzado. Sanos (16)	2 días	Café (CF= 80 mg) y café descafeinado	↑ PAS*, PAD*
McMullen y cols. (2011)	Aleatorizado, doble ciego, cruzado. Sanos (12)	4 días	Cápsula de CF (0, 67, 133 y 200 mg)	↑ PAS*, PAD
Mubarak y cols. (2012)	Aleatorizado, doble ciego, controlado, cruzado. Sanos (23)	2 días	Ácido clorogénico puro (5-CQA= 400 mg) o agua	↓ PAS, PAD*
Papamichael y cols. (2005)	Aleatorizado, ciego, controlado, cruzado. Sanos (17)	2 días	Café (CF= 80 mg) y café descafeinado (CF< 2 mg)	↓ FMD* con café y no varía con café descafeinado
Verhoef y cols. (2002)	Aleatorizado, cruzado. Sanos (48)	3 días	Café filtrado (CF= 870 mg/d), cápsula (CF= 870 mg/d), placebo	↑ homocisteína con CF pura y café

(Tabla 7. Continuación)

Estudios de intervención crónicos				
	Diseño del estudio (n)	Duración total	Tratamiento y composición (cantidad)	Resultados
Bakuradze y cols. (2011)	No aleatorizado, no ciego, no cruzado, controlado. Sanos (33)	12 semanas	Café verde-tostado (DHC= 435, CF= 540 mg/L)	↓ Peso*, IMC* y grasa corporal*
Correa y cols. (2013)	Aleatorizado, cruzado. Sanos (20)	9 semanas	Café tostado ligero (DHC= 1002, CF= 693, cafestol=16,2 y kahweol= 2,4 mg/d) y medio (DHC= 630, CF= 732, cafestol= 18,9 y kahweol= 1,5 mg/d)	↑ CT*, LDL-C* y sVCAM-1* en ambos casos
Farag y cols. (2005)	Aleatorizado, doble ciego, cruzado, controlado. Sobrepeso (85)	4 semanas	Cápsula de CF (0, 300 o 600 mg)	↓ PAS*, PAD* en el grupo tolerante
Hoelzl y cols. (2010)	Aleatorizado, cruzado. Sanos (29)	8 semanas	Café verde-tostado (DHC= 300 mg)	↓ LDLox, MDA
Kempf y cols. (2010)	No aleatorizado, ciego, cruzado. Sanos (47)	3 meses	Café filtrado (4 u 8 tazas al día, composición no proporcionada)	↓ IL-18 y ↑ adiponectina IL-6 y PCR no varían
Kozuma y cols. (2005)	Aleatorizado, doble ciego, paralelo. Hipertensos e hipercolesterolémicos (117)	28 días	Extracto de café verde (5-CQA= 0, 25, 50, 100 mg/d)	↓ PAS*, CT*, LDL
Mursu y cols. (2005)	No aleatorizado, no ciego. Sanos (43)	5 semanas	Café filtrado (DHC= 0, 364 o 728 mg/d y CF= 0, 300 o 600 mg/d)	Lípidos y susceptibilidad a la oxidación no varían
Natella y cols. (2008)	No aleatorizado, no ciego, no controlado, no cruzado. Sanos (10)	4 semanas	Café o tableta de CF (180 mg)	↓ agregación plaquetaria*
Ochiai y cols. (2004)	No aleatorizado, ciego, no cruzado, paralelo. Sanos (20)	4 meses	Extracto de café verde (5-CQA= 140 mg/d)	↓ PAS, PAD, CT
Ochiai y cols. (2009)	Aleatorizado, doble ciego, controlado. Hipertensos (23)	8 semanas	Café soluble (DHC= 300 mg/d, CF= 79 mg/d, HHQ= 0,03 mg/d)	↓ PAS*, PAD, peso, LDL-C, TGC ↑CT, HDL-C

(Tabla 7. Continuación)

Shechter y cols. (2011)	Aleatorizado, doble ciego, controlado, cruzado. Sanos y pacientes coronarios (80)	2 semanas	Cápsula de CF (200 mg) o placebo.	↓ PCR* ↑ adiponectina
Thom (2007)	Aleatorizado, doble-cego, controlado. Obesos (30)	12 semanas	Café y café enriquecido en DHC (DHC= 30-40 mg)	↓ peso
Van Rooij y cols. (1995)	Aleatorizado, doble ciego, controlado, paralelo. Sanos (36)	6 semanas	Aceite de café verde (Arábica= 85 g/kg kahweol y 68 g/kg cafestol; Robusta= 1 g/kg kahweol y 29 g/kg cafestol)	↑ CT, TG y ALT con Arábica
Vinson y cols. (2012)	Aleatorizado, doble ciego, cruzado. Obesos (16)	8 semanas	Café, café enriquecido y placebo (DHC= 700, 1050 y 0 mg/d)	↓ Peso*, IMC*, grasa corporal*, FC*
Watanabe y cols. (2006)	Aleatorizado, doble ciego, controlado. Hipertensos (28)	14 semanas	Extracto de café verde (5-CQA= 140 mg/d) o placebo	↓ FC, PAS, PAD
Westerterp y cols. (2005)	Aleatorizado, doble ciego, controlado, paralelo. Sobrepeso (76)	4 meses	Cápsula de té con CF (CF= 150 mg, EGCG= 270 mg)	↓ Peso*, grasa en cintura, leptina
Yamaguchi y cols. (2008)	Aleatorizado, doble ciego, controlado. Sanos e hipertensos (203)	6 semanas	Café con diferentes dosis de DHC y HHQ (DHC= 0-299, HHQ= 0,02-1,7, CF= 75-81 mg/d)	↓ PAS*, PAD* a > dosis de DHC y < dosis de HHQ
Yukawa y cols. (2004)	Diseño no especificado. Sanos (11)	1 semana	Café Arábica (24 g/450 mL)	↑ tiempo de oxidac. LDL* ↓ CT, LDL-C*, MDA*, TG

ALT: alanin aminotransferasa; CF: cafeína; CT: colesterol total; DHC: derivados hidroxycinámicos; FC: frecuencia cardiaca; FMD: dilatación mediada por flujo; HDL-C: lipoproteína de alta densidad; HHQ: hidroxihidroquinona; IL: interleuquina; IMC: índice de masa corporal; LDL-C: lipoproteína de baja densidad; LDL-ox: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1; MDA: malondialdehído; PA: presión arterial; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica; PCR: proteína C reactiva; PF: polifenoles; sICAM-1: molécula de adhesión intercelular soluble-1; sVCAM-1: molécula de adhesión vascular soluble-1; TG: triglicéridos.

* cambios significativos ($p < 0.05$)

2.5.2.4.1. Enfermedad Cardiovascular

El café ha sido tradicionalmente asociado a una serie de efectos perjudiciales a nivel vascular y arterial debido a su contenido en CF (Cornelis y El-Sohehy, 2007; Riksen y cols., 2009) y diterpenos (Bonita y cols., 2007); sin embargo, en los últimos años se está cuestionando la asociación entre el consumo de café y la prevalencia de ECV. En la revisión de Di Castelnuovo y colaboradores (2012) se recogen los efectos negativos del café: incremento de la presión sanguínea, resistencia vascular sistémica, actividad de renina, epinefrina y norepinefrina, endurecimiento de las arterias, efectos producidos a nivel de la función endotelial en personas sanas, además de un incremento en los niveles de lípidos séricos y de homocisteína. Sin embargo, estos efectos adversos pueden ser contrarrestados por el efecto favorable del café en la diabetes tipo 2 y la ausencia de asociación con la hipertensión descrita en mujeres. Además, un estudio agudo reciente con CF mostró una asociación entre el café y el incremento en la FMD, así como un descenso en los niveles de PCR en población sana y de riesgo cardiovascular. En este mismo año, se ha publicado un estudio en el que se ha evaluado la calidad de vida de 11423 españoles, concluyendo que no hay una asociación entre el consumo de café y el desarrollo de algunas enfermedades crónicas (diabetes, distintos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.; López-García y cols., 2014) y descartando el mayor riesgo de mortalidad por ECV en sujetos que previamente habían sufrido un evento cardiovascular al consumir café cafeinado y filtrado (López-García y cols., 2011).

➤ Función endotelial

Son escasos los estudios que abordan los efectos del café sobre la función endotelial: algunos sugieren que el café cafeinado produce efectos agudos adversos (Papamichael y cols., 2005; Buscemi y cols., 2010) mientras que el café descafeinado produce efectos beneficiosos (Buscemi y cols., 2009). Los efectos positivos han sido atribuidos a los ácidos CA y 5-CQA, que disminuyen la producción de ROS y aumentan la biodisponibilidad endotelial de NO, factores claves en la correcta función endotelial (Suzuki y cols., 2006). También se ha descrito que el 5-CQA evita la inactivación de la paraoxonasa-1 en las lipoproteínas humanas, permitiendo así su efecto protector frente a la peroxidación de LDL (Gugliucci y Bastos, 2009). Además, el ácido dihidrocaféico, uno de los principales metabolitos derivados de los ácidos hidroxicinámicos del café, es un antioxidante intracelular que captura los ROS en células endoteliales humanas, aumentando la actividad óxido nítrico sintetasa y, por tanto, contribuyendo a la mejora de la función endotelial. El derivado dicafeoilquinico ejerce su papel cardioprotector a

través de la inhibición de angiotensina II en células de la musculatura lisa, favoreciendo así la vasodilatación (Chiou y cols., 2009). Durante el proceso de tostado del café se forma hidroxihidroquinona (HHQ), que puede inhibir la acción endotelial del 5-CQA. Sin embargo, el café verde prácticamente carece de este componente, además de presentar una mayor proporción de 5-CQA, lo que asegura sus efectos positivos a nivel endotelial (Ochiai y cols., 2009). Buscemi y colaboradores (2009) evaluaron el consumo agudo de café descafeinado en la función endotelial de un grupo de sujetos sanos y observaron una mayor FMD al incrementar la dosis de 1 a 2 tazas de café expreso descafeinado y, por tanto, se puede atribuir este efecto al incremento de la ingesta de derivados hidroxicinámicos (composición polifenólica no proporcionada).

Teniendo en cuenta la influencia positiva de los compuestos fenólicos del café en la función endotelial, el efecto adverso del café cafeinado podría relacionarse con la CF. Sin embargo, los efectos negativos de este compuesto, que han sido citados anteriormente, no están tan claros, ya que un estudio con esta metilxantina no produjo cambios en la FMD de una población de riesgo cardiovascular (Duffy y cols., 2001) y en un estudio controlado con placebo la ingesta de CF (200 mg) mostró una mejoría aguda en la FMD tanto en sujetos sanos como en sujetos de riesgo cardiovascular (Shechter y cols., 2011).

➤ Función plaquetaria

El riesgo de arteriosclerosis y la susceptibilidad a la agregación y coagulación pueden ser modulados a través de la reducción de la activación de las plaquetas, la trombosis y la inflamación. El efecto anti-plaquetario demostrado para el vino, los zumos de frutas o el té (Nardini y cols., 2007) podría hacerse extensivo al café. En un estudio cruzado en humanos llevado a cabo con café y cápsulas de CF, se observó que el consumo de café, que contenía 180 mg de CF, producía un descenso en la agregación plaquetaria, estando implicados el colágeno y el ácido araquidónico. Por el contrario, no se observó dicho efecto tras ingerir un comprimido que contenía la misma cantidad de CF, lo que sugiere que otros componentes del café están implicados en el proceso anti-agregante. Los polifenoles del café podrían ser los responsables de este efecto, ya que se observó un incremento en la concentración plasmática de ácidos fenólicos tras ingerir una bebida de café (Natella y cols., 2008).

Los efectos del consumo moderado de café en la función plaquetaria también se han demostrado usando el modelo de rata arteriosclerótica, en el que el café disminuyó significativamente el volumen plaquetario medio, el porcentaje de volumen de sangre ocupado por las plaquetas y la distribución de las plaquetas de las ratas que tomaron una dieta hipergrasa en comparación con las que tomaron una dieta control (Bhaskar y Rauf, 2009). En estudios *in vitro*, el ácido 5-CQA ha mostrado un papel inhibidor de la

actividad de los enzimas COX-1 y COX-2 y de la expresión de P-selectina en plaquetas (Park, 2009) bloqueando así la activación plaquetaria.

➤ Lipemia

El consumo de café se ha relacionado tradicionalmente con un efecto negativo sobre los lípidos en sangre aumentando los niveles séricos de CT y LDL-C. Los diterpenos cafestol y kahweol, presentes de forma natural en las semillas de café, han sido identificados como los componentes responsables en gran parte de la respuesta hipercolesterolemia (Hammar y cols., 2003). En este sentido es importante la forma de preparar la bebida, ya que los diterpenos, por su solubilidad en agua hirviendo, están presentes en el café hervido, pero quedan fácilmente retenidos en el filtro cuando se prepara café filtrado (Thelle y Strandhagen, 2005). El contenido de cafestol y kahweol también depende del ratio de café Arábica/Robusta, ya que los granos de café Arábica contienen mayores cantidades de los dos diterpenos que los de Robusta (Mensink y cols., 1995).

Sin embargo, aún no existe un consenso acerca del efecto del café sobre los niveles de lípidos séricos. En un estudio en sujetos sanos que tomaron agua mineral durante una semana y después 24 g de café diarios (8 g de café soluble en 150 mL de agua, tres veces al día) también durante 1 semana, se observó una reducción significativa en los niveles de CT, LDL-C, malondialdehído (MDA) y especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), además de una reducción en la susceptibilidad a la oxidación de las LDL tras la intervención con café (Yukawa y cols., 2004). En otro estudio más reciente llevado a cabo en consumidores habituales de café, tras un periodo de abstención de un mes, los participantes bebieron 4 tazas diarias de café filtrado (composición polifenólica no aportada por los autores) durante el segundo mes y en el tercer mes tomaron 8 tazas al día, observando que las concentraciones de CT, HDL-C y Apo A-I incrementaron en un 12%, 7% y 4%, respectivamente, mientras que los ratios de LDL/HDL-C y Apo B/Apo A-I disminuyeron significativamente en un 8% y 9%, respectivamente (comparación de 8 tazas/día con 0 tazas/día) (Kempf y cols., 2010).

En un estudio *ex vivo* la ingesta de café incrementó la expresión del transportador tipo ABC (ATP binding cassette) y del receptor SR-BI en macrófagos, ambos conocidos por favorecer el eflujo de colesterol celular mediado por HDL y, por lo tanto, inhibir la formación de células espumosas (Uto-Kondo y cols., 2010). Efectos beneficiosos del café sobre la lipemia también han sido descritos en estudios en ratas (Bhaskar y Rauf, 2009) o ratón (Tijburg y cols., 1997) tras la ingesta de dietas hipergrasas o altas en colesterol. El compuesto fenólico mayoritario, el ácido clorogénico, redujo la formación de la lesión

arteriosclerótica en un 40% en la aorta torácica en ratones sometidos a una dieta hipercolesterolémica (Loke y cols., 2010).

➤ Presión arterial

Se ha sugerido que el café puede aumentar el riesgo cardiovascular por su efecto hipertensor, atribuido a su contenido en CF, que puede elevar los niveles plasmáticos de hormonas del estrés tales como epinefrina, norepinefrina y cortisol (Lane y cols., 2002). Sin embargo, estos efectos difieren según el consumo sea agudo o crónico (Riksen y cols., 2009). Estudios recientes muestran que el consumo de café en espacios de tiempo cortos produce un incremento en la tensión arterial, mientras que el consumo moderado (1-3 tazas/día) a largo plazo no se asocia con la hipertensión (Jee y cols., 1999; Noordzij y cols., 2005). McMullen y colaboradores (2011) estudiaron el efecto postprandial de la dosis en un grupo de sujetos normotensos, observando un incremento de la PA al aumentar la ingesta de CF de 67 a 133 mg, mientras que con 200 mg se mostraba una tolerancia total sin efectos sobre la PA. En cambio, 1 h tras la ingesta de café expreso con 250 mg de CF, Corti y colaboradores (2002) observaron incrementos de 12,6 y 7,1 mm Hg en la PA sistólica y diastólica, respectivamente, en un grupo de consumidores no habituales, mientras que no hubo cambios significativos para el grupo de consumidores habituales. En una revisión reciente de 5 intervenciones en individuos hipertensos (ingestas entre 200-300 mg de CF) se describió un incremento agudo medio de 8,1 mm Hg en la PA sistólica y 5,7 mm Hg en la diastólica, lo cual indica que la CF tiene efectos agudos comparables en individuos normotensos e hipertensos (Bohn y cols., 2012). Sin embargo, en un estudio de consumo crónico de café se observó un claro incremento en la tensión arterial en sujetos hipertensos (Celermajer, 1997; Mesas y cols., 2011).

Los estudios epidemiológicos CARDIA (Lewis y cols., 1993), Framingham (Wilson y cols., 1989) o MONICA (Kirchhoff y cols., 1994), que han evaluado el riesgo que supone el consumo del café desde el punto de vista de la tensión arterial, concluyen que hay una asociación negativa entre el consumo de esta bebida y la mortalidad por hipertensión. Asimismo, en las mujeres que participaron en The Nurses' Health Study, la ingesta diaria de hasta 6 tazas de café no estaba asociada con un incremento en la tensión arterial (López-García y cols., 2006b), ni tampoco en los hombres que participaron en el Copenhagen Male Study (Gyntelberg y cols., 1995).

Sin embargo, el efecto hipertensor del café también ha sido observado al consumir café descafeinado, por lo que otros ingredientes del café distintos a la CF podrían estar implicados (Corti y cols., 2002). El efecto negativo del café en la PA puede ser contrarrestado por los compuestos fenólicos que contiene esta bebida. Así, un extracto

de café enriquecido en derivados hidroxicinámicos, en concreto con 5-CQA puro, produjo una respuesta hipotensiva en ratas (Suzuki y cols., 2002). Teniendo en cuenta la metabolización de estos compuestos, la menor PA observada podía asociarse a los metabolitos CA y/o FA. De hecho, en el mismo estudio se observó que la administración intravenosa de estos metabolitos puros dio lugar a un descenso en la PA sistólica, mayor con CA que con FA, alegando la capacidad de estos constituyentes de capturar aniones superóxido y favorecer por tanto la biodisponibilidad de NO en los vasos sanguíneos (Toda y cols., 1991).

La mayoría de estos estudios se han realizado con café tostado, si bien la mayor concentración fenólica del café verde debería de potenciar los efectos saludables de este alimento. En concordancia, un grupo de sujetos sanos que suplementaron su dieta con un extracto de café verde, que aportaba 140 mg diarios de 5-CQA, redujeron su PA sistólica y diastólica en 5 y 4,2 mm Hg, respectivamente, tras 4 meses de consumo (Ochiai y cols., 2004), mientras que el mismo producto consumido por sujetos medianamente hipertensos durante el mismo periodo de tiempo reducía la PA sistólica y diastólica de los voluntarios en 10 y 7 mm Hg, respectivamente (Watanabe y cols., 2006), sugiriendo que los efectos positivos podrían intensificarse en los pacientes con un mayor riesgo. Los mecanismos responsables del efecto favorable del consumo crónico de café sobre la tensión arterial no son conocidos.

2.5.2.4.2. Inflamación

El café y los extractos de café han demostrado tener un efecto inhibidor de la expresión de genes implicados en la inflamación (Paur y cols., 2010). El ácido clorogénico (5-CQA) y su metabolito CA parecen inhibir la expresión de la IL-1 β , así como de sVCAM-1 y sICAM-1 (Chang y cols., 2010), mientras que la CF reduce los niveles de IL-6 y TNF- α en ratas (Li y cols., 2011). El diterpeno kahweol, además de reducir la secreción de MCP-1 (Cárdenas y cols., 2011), es capaz de inhibir la expresión de moléculas de adhesión inducida por TNF- α mediante la ruta de señalización de NF- κ B en células endoteliales (Kim y cols., 2006). Sin embargo, cada uno de estos compuestos aisladamente no parecen tener la misma eficacia, sugiriendo que el poder anti-inflamatorio del café deriva del efecto sinérgico de todos o algunos de sus componentes bioactivos (Chu y cols., 2011).

En animales de experimentación, los compuestos fenólicos del café redujeron las lesiones en la aorta en un modelo de ratón aterosclerótico a través de la modulación de la inflamación (Loke y cols., 2010). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que los derivados hidroxicinámicos y las metilxantinas están implicados en la respuesta anti-inflamatoria, dificultando la migración de los leucocitos hacia al espacio sub-endotelial e

inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión (Zhao y cols., 2008; Pan y cols., 2010). Sin embargo, algunos estudios en humanos no han observado efectos del café a nivel de inflamación. Así, el consumo de 4 u 8 tazas de café durante un mes no influyó en los niveles plasmáticos de IL-6 en sujetos sanos, consumidores habituales de café, con respecto al consumo de agua (Kempf y cols., 2010). El consumo agudo de 200 mL de café tampoco tuvo un efecto sobre esta citoquina pro-inflamatoria a nivel postprandial (Gavrieli y cols., 2011). Por el contrario, en sujetos sanos que durante un año mantuvieron sus ingestas habituales el café, que consistían entre 0 y 4 tazas diarias, se observó una tendencia a disminuir los niveles de IL-6, así como de TNF- α (Yamashita y cols., 2012), por lo que el efecto anti-inflamatorio del café podría ser consecuencia de un consumo sostenido durante tiempos mayores a un mes. En ese mismo estudio se describió una asociación inversa entre el consumo de café y los niveles plasmáticos de PCR (Yamashita y cols., 2012). De forma similar, López-García y colaboradores (2006a) asociaron las ingestas elevadas de café y café descafeinado con menores niveles circulantes de PCR en mujeres diabéticas y sanas, respectivamente, y, además, observaron una tendencia a reducir los niveles de sICAM-1 y E-selectina en ambos grupos de mujeres, tras consumir tanto café con CF como descafeinado, descartando así la implicación de esta metilxantina en la disfunción endotelial. A nivel postprandial, los niveles de PCR disminuían tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad coronaria tras ingerir 200 mg de CF (Shechter y cols., 2011), confirmando un efecto beneficioso independientemente del estado de salud. El estudio ATTICA concluye que hay una asociación positiva entre la ingesta de café y los niveles de PCR en hombres y mujeres que consumen más de 200 mL diarios de esta bebida (Zampelas y cols., 2004); sin embargo, Rebello y colaboradores (2011) no encontraron un efecto del café en las concentraciones de PCR en un meta-análisis llevado a cabo en sujetos que consumían entre 0 y 3 tazas diarias.

La ingesta de café puede modular la respuesta inflamatoria mediante otro mecanismo: estimulando los efectos de los corticoesteroides. Las histonas deacetilasas son reclutadas por los corticoesteroides suprimiendo los genes de inflamación. Bajas dosis de TP, metabolito del café, estimulan la actividad de las histonas deacetilasas en las células epiteliales y macrófagos, favoreciendo los efectos anti-inflamatorios de los corticoesteroides (Barnes y Adcock, 2003).

2.5.2.4.3. Estrés oxidativo

La ingesta de café ha demostrado reducir la susceptibilidad de las lipoproteínas LDL a la oxidación *ex vivo* (Yukawa y cols., 2004). Dos estudios en humanos que han evaluado los efectos en salud del consumo de café han observado una disminución significativa en la peroxidación de lípidos/isoprostanos (Mursu y cols., 2005; Kempf y

cols., 2010). Diversos estudios han descrito una asociación inversa entre la ingesta de café y los niveles de la enzima gamma glutamil transferasa (GGT), potencial biomarcador de daño oxidativo en el hígado (Poikolainen y Vartiainen, 1997; Nakanishi y cols., 2000). Una intervención de 4 semanas de duración con café mostró una reducción en el daño oxidativo al ADN y el incremento de las defensas antioxidantes (glutación y glutación reductasa) (Bakuradze y cols., 2011).

2.5.2.4.4. Obesidad y Diabetes

La CF, el ácido clorogénico y el magnesio son los principales componentes bioactivos del café implicados en el metabolismo de la glucosa. Estudios epidemiológicos revisados por Van Dam y Hu (2005) y por Zhang y colaboradores (2009) apuntan a una asociación inversa entre el consumo de café y el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, siendo los mecanismos responsables la menor absorción de glucosa y los menores niveles de insulina en sangre. Estos efectos podrían ser contrarrestados por las propiedades hiperglicemiantes de la CF (Johnston y cols., 2003); sin embargo, el consumo moderado tanto de café descafeinado como de café regular y otras bebidas conteniendo CF sugiere una relación inversa con el desarrollo de diabetes tanto en hombres como en mujeres (Salazar-Martínez y cols., 2004).

Los compuestos derivados de los ácidos hidroxycinámicos pueden inhibir la α -amilasa pancreática y en consecuencia reducir la digestibilidad de los carbohidratos de la dieta y disminuir el índice glicémico de los alimentos (Narita y Inouye, 2009). Al consumir café, la mayor absorción de glucosa inducida por la CF se contrarresta con la capacidad de los ácidos hidroxycinámicos de reprimir el transportador de glucosa GLUT2 y el transportador dependiente de sodio SGLT-1, disminuyendo así la absorción intestinal de glucosa (Oliveira y cols., 2008). Adicionalmente, el 5-CQA parece inhibir la actividad de las enzimas hepáticas glucosa-6-fosfatasa y glucosa-6-fostato translocasa, afectando así la gluconeogénesis y glucogenolisis hepática (Arion y cols., 1997; Henry-Vitrac y cols., 2010). Recientemente también se ha demostrado la capacidad del 5-CQA para estimular el transporte de glucosa en el músculo esquelético y otros tejidos periféricos, aumentando la expresión del transportador GLUT4, así como de receptores tisulares de insulina (Ong y cols., 2012). Todos estos procesos asociados al ácido clorogénico implicarían un efecto hipoglucemiante y una mejora en la sensibilidad tisular a insulina, ejerciendo un efecto beneficioso en diabetes tipo 2. Además, el magnesio podría tener un efecto positivo en el metabolismo de la glucosa al aumentar la sensibilidad a insulina (De Valk, 1999).

El café es un alimento interesante desde el punto de vista del control del peso, ya que, además de presentar una rica composición bioactiva, tiene un bajo valor

energético, y al mismo tiempo produce un efecto saciante gracias a su contenido en CF (Kovacs y cols., 2004). Además, el café activa el metabolismo energético por inducción de catecolamina o por inhibición de los receptores de adenosina (Greenberg y cols., 2006).

Los compuestos polifenólicos del café también están implicados en el control de peso. En animales, los polifenoles del café han mostrado un mayor metabolismo energético y una menor lipogénesis por reducción de SREBP-1 que a su vez regula la acumulación de grasa (Murase y cols., 2011). En un estudio en voluntarios obesos se evaluó el efecto del café, describiendo un descenso de 1,7 kg de peso corporal y 3,6% de grasa corporal al consumir un producto soluble de café con la misma proporción de café Arábica y Robusta y un contenido natural en derivados hidroxicinámicos (30-40 mg/g), y de 5,4 kg y 0,7% cuando el mismo café era enriquecido con estos componentes (90-100 mg/g) (Thom, 2007). Aunque la mayoría de las investigaciones hasta la fecha sobre el efecto anti-obesidad del café se han llevado a cabo con café tostado, la ingesta durante 4 semanas de un producto mezcla de café tostado y verde, que aportaba 145 mg diarios de ácido clorogénico, indujo los mismos efectos en un grupo de hombres sanos con un ligero sobrepeso, quienes redujeron significativamente el peso corporal en 0,6 kg y el IMC en 0,2 kg/m² con respecto al consumo de agua (Bakuradze y cols., 2011). Estos efectos fueron además corroborados en sujetos con sobrepeso quienes, tras tomar dos y tres dosis diarias de un extracto de café verde que aportaban 700 o 1050 mg, respectivamente, de derivados hidroxicinámicos, reducían más de un 10% el peso corporal, IMC y porcentaje de grasa con respecto a la situación basal (Vinson y cols., 2012).

El tejido adiposo, además de ser un almacén de grasa, es un órgano secretor de las adipoquinas leptina, resistina, visfatina y activador de plasminógeno 1 (PAI-1). Los mecanismos biológicos implicados en el control del peso corporal podrían ser explicados por la comunicación entre estas adipoquinas y los órganos metabólicos, pero poco se sabe acerca de la influencia de los polifenoles y las metilxantinas en la regulación de estas adipoquinas. Tanto los ácidos CA y 5-CQA como la CF han mostrado reducir la grasa corporal y los niveles de leptina en animales (Greenberg y cols., 2006). La leptina y adiponectina juegan un papel importante en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, así como en la regulación de la inflamación (Cao, 2014). En un estudio transversal llevado a cabo en trabajadores sanos japoneses con un IMC < 25 kg/m², el consumo de café estaba asociado positivamente con adiponectina e inversamente con leptina (Yamashita y cols., 2012). Recientemente, en otro estudio llevado a cabo en trabajadores japoneses (Pham y cols., 2014) se encontró una relación inversa entre el consumo de café y los niveles de leptina y PAI-1; sin embargo, estos resultados también fueron acompañados de un incremento en los niveles de resistina, conocida como la adipoquina de la resistencia a insulina (Jamaluddin y cols., 2012). Distintos mecanismos

pueden explicar la asociación entre el consumo de café y CF con los niveles de leptina y PAI-1. La leptina es una hormona secretada exclusivamente por los adipocitos, y el café, que es rico en ácido cafeico y clorogénico, ha demostrado disminuir la masa grasa y bajar los niveles de leptina en ratones, efecto que también ha sido observado en otros roedores sobre sus depósitos adiposos y el número de adipocitos. Además, el consumo regular de café ha sido inversamente relacionado con inflamación de bajo grado y con marcadores de estrés oxidativo, ambos relacionados con concentraciones altas de leptina. PAI-1 también es producido por los adipocitos; por lo tanto, el efecto reductor de la adiposidad por parte del café influye en PAI-1 de manera similar que con la leptina (Pham y cols., 2014).

La elevada concentración de polifenoles en el café podría igualmente contribuir al control de las hormonas gastrointestinales. El ácido 5-CQA es capaz de modular la secreción de estas hormonas, aumentando los niveles plasmáticos del péptido GLP-1 y disminuyendo los del polipéptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP) (Johnston y cols., 2003). Sin embargo, la grelina, hormona que estimula el apetito, no mostró cambios en un estudio agudo y cruzado en el que los voluntarios tomaron café con un contenido de 3 mg de CF por kg de peso corporal, café descafeinado o agua y tampoco modificó la sensación de apetito, ni la ingesta energética u otros marcadores relacionados con el apetito, la inflamación, el estrés o el metabolismo de la glucosa, pero si incrementó las concentraciones circulantes de cortisol (Gavrieli y cols., 2011).

2.5.2.4.5. Sistema Nervioso Central

La CF, que produce la activación de los neurotransmisores y las funciones cognitivas, no sólo ayuda a estar alerta (Heckman y cols., 2010), sino también mejora el estado de ánimo y tiene efectos antidepresivos (Kaplan y cols., 1997). Sin embargo, otras sensaciones fisiológicas negativas tales como taquicardia y ansiedad, entre otros efectos sobre el sistema nervioso central, también están asociadas a elevadas dosis de CF (Mitchel y cols., 2011), por lo que la EFSA recomienda no consumir más de 400 mg diarios de esta metilxantina. Además, los efectos de la CF varían según la tolerancia a este compuesto, por lo que en general los consumidores no habituales de café perciben sus efectos con mayor intensidad (Mitchel y cols., 2011).

Por otro lado, el consumo de café está inversamente asociado al desarrollo de ciertas enfermedades neurodegenerativas, tales como el Parkinson. La CF, por su conocido papel como antagonista del receptor de adenosina A₂, es capaz de inhibir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Chen y cols., 2001), tal como se ha descrito en diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo entre 1986 y 2001 que han sido revisados recientemente por Ludwig y colaboradores (2014). Los distintos

efectos observados en función del género parecían ser consecuencia del uso de hormonas atendiendo a los estudios realizados únicamente en hombres (Honolulu Heart Study), que mostraban un menor riesgo de sufrir Parkinson al aumentar el número de tazas de café (Abbott y cols., 1998), frente a mujeres menopáusicas que presentaban un mayor riesgo cuando ingerían estrógenos (Nurses' Health Study) (Ascherio y cols., 2003; 2004).

2.5.2.4.6. Cáncer

Entre los componentes de la dieta, los polifenoles podrían ser los principales agentes con carácter quimiopreventivo (Martin y cols., 2013). El ácido clorogénico del café puede ejercer su papel anti-cancerígeno aumentando la expresión de enzimas antioxidantes e inhibiendo la activación de las distintas señales implicadas en la proliferación celular, así como la apoptosis de células tumorales (Feng y cols., 2005). Los ácidos hidroxycinámicos también han mostrado un papel anti-proliferativo en células cancerígenas por inhibición de las topoisomerasas I y II (González de Mejía y cols., 2005). Por otra parte, los diterpenos presentes en café podrían también contribuir a esa acción anti-cancerígena al inducir enzimas antioxidantes como la glutatión S-transferasa y la hemo-oxigenasa-1, o inhibir algunas isoenzimas pro-carcinogénicas del citocromo P450 (Cavin y cols., 2002).

El consumo de café se ha asociado a la disminución de ciertos tipos de cáncer como el de piel, mama, endometrio, hígado y colon (Kim y cols., 2013; Ludwig y cols., 2014). Concretamente, el riesgo de padecer cáncer de endometrio se reduce entre un 50-60% al consumir 3 o más tazas diarias de café (Hirose y cols., 2007; Bravi y cols., 2009). De forma similar, una reducción del 50% en el desarrollo de cáncer hepatocelular ha sido asociado con el consumo de tan sólo 1 taza de café al día (Kurozawa y cols., 2005), llegando incluso a proteger en un 70% con un consumo mayor de 5 tazas (Gelatti y cols., 2005). Según un estudio llevado a cabo en mujeres menopáusicas, aquellas que consumían café de forma habitual tenían un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Baker y cols., 2006). Giovannucci (1998) describió una reducción del 24% del riesgo de padecer cáncer colorrectal en sujetos que consumían al menos 4 tazas diarias de café comparado con consumidores no habituales. De forma similar, otros estudios más recientes (Galeone y cols., 2010; Tian y cols., 2013) también encuentran una relación inversa entre el consumo de café y este tipo de cáncer.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de las numerosas evidencias científicas que muestran que una dieta sana y equilibrada unida a la realización de ejercicio físico son factores fundamentales en la prevención de enfermedades cardiovasculares, la incidencia de estas patologías continúa creciendo en nuestra sociedad. En las últimas décadas se ha producido un cambio importante en los hábitos de vida de la población española, alejándose del patrón de dieta Mediterránea y aumentando el sedentarismo, lo que ha resultado en un marcado incremento en la incidencia no sólo de enfermedades cardiovasculares, sino también de dos patologías estrechamente vinculadas, como son la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. Especialmente preocupante es el incremento de estas dolencias en la población infantil.

Paradójicamente, en los últimos años también se ha experimentado un creciente interés de la población por adoptar hábitos de vida más saludables, a lo que han contribuido los mensajes emitidos por las autoridades sanitarias y científicas, así como la puesta a disposición de los consumidores de un amplio abanico de alimentos con propiedades mejoradas y suplementos dietéticos por parte de la industria agroalimentaria, los conocidos como *alimentos funcionales* y *nutracéuticos*. La responsabilidad y compromiso de la industria alimentaria, más allá de garantizar la seguridad de sus productos, está en la mejora de la calidad de los mismos. La incorporación de ingredientes con propiedades biológicas beneficiosas para la salud, los ingredientes funcionales, o la mejora del procesado de los alimentos para mantener sus nutrientes y componentes bioactivos, son dos de las principales estrategias seguidas para la producción de los alimentos funcionales. Éstos, además de sus propiedades nutricionales, aportan otros fitoquímicos que, aunque en muchos casos no son considerados nutrientes esenciales, presentan una importante actividad biológica, como es el caso de fibra dietética, los polifenoles y las metilxantinas.

La fibra dietética es altamente beneficiosa para la salud gastrointestinal, pero ha sido además asociada a la prevención de desórdenes metabólicos como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad cardiovascular. De forma similar, los polifenoles en general y los flavanoles de manera especial, por sus efectos antioxidantes, anti-inflamatorios, hipotensivos e hipocolesterolemiantes, entre otros, contribuyen a una correcta función endotelial y a la prevención en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, aunque también se han descrito importantes beneficios en diabetes, obesidad, cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Finalmente, las metilxantinas están emergiendo como componentes de gran interés pues, de la misma manera que ocurrió con los polifenoles, las incipientes evidencias sobre sus efectos saludables están desplazando a los efectos contraproducentes tradicionalmente asociados a estos

compuestos. La cafeína, la más conocida metilxantina, no sólo contribuye a las funciones cognitivas, sino que también participa en el control de la obesidad, mientras que la teobromina ejercería efectos hipoglucémicos y reguladores del colesterol.

El cacao, por su contenido natural en fibra dietética, polifenoles (mayoritariamente flavanoles monoméricos y procianidinas) y metilxantinas (principalmente teobromina), es considerado un alimento funcional de alto valor nutricional. Así, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió en 2012 una opinión favorable que reconocía que, gracias a su contenido en flavanoles, este alimento contribuía a prevenir la enfermedad cardiovascular y otras patologías asociadas. Estas propiedades beneficiosas del cacao, así como el amplio consumo y gran aceptabilidad del cacao y sus productos derivados por todos los sectores de la población, lo hacen un alimento idóneo sobre el que aplicar las estrategias de mejora de la calidad antes mencionadas. Por ello, en la actualidad este alimento está siendo enriquecido en sus propios ingredientes funcionales. No obstante, los efectos beneficiosos en salud de estos nuevos productos de cacao deben ser corroborados.

Otro de los alimentos de mayor consumo en nuestra dieta, el café, presenta también una rica composición en compuestos polifenólicos (principalmente ácidos hidroxycinámicos) y metilxantinas (mayoritariamente cafeína). Este alimento se ha caracterizado por ayudar a mejorar el rendimiento físico y el estado de ánimo. Además, empiezan a acumularse las evidencias científicas que apoyan su papel beneficioso en la prevención de enfermedades crónicas, tales como la diabetes o la enfermedad cardiovascular, gracias a sus efectos hipocolesterolemiantes y antiobesidad, entre otros. El procesado térmico para la elaboración del café es responsable de sus cualidades organolépticas, pero supone la pérdida de una parte de su composición bioactiva, principalmente polifenoles. Encontrar un equilibrio entre el aroma del café y sus propiedades nutricionales ha sido el reto que ha llevado a la industria a elaborar nuevos productos conteniendo café sin tostar, más conocido como café verde.

Para entender las funciones biológicas de estos componentes sobre la salud humana no basta con identificar sus mecanismos de acción, sino que también es imprescindible evaluar su biodisponibilidad y la dosis necesaria para conseguir el efecto deseado. Por ello es esencial llevar a cabo estudios de intervención en humanos que permitan evaluar la absorción y metabolización de los ingredientes bioactivos. Hasta la fecha, la biodisponibilidad de polifenoles ha sido ampliamente estudiada y hoy día se sabe que estos compuestos tienen una absorción limitada; sin embargo, un consumo diario y reiterado podría garantizar su acción biológica. Por el contrario, las metilxantinas son compuestos altamente absorbidos y rápidamente metabolizados en el organismo humano a otras metilxantinas y ácidos metilúricos en el hombre, aunque este conocimiento procede principalmente del estudio de la biodisponibilidad de

metilxantinas puras, siendo necesario ahondar en el conocimiento del posible efecto de la matriz alimentaria en su biodisponibilidad.

Por otra parte, es necesario evaluar el efecto beneficioso de alimentos o ingredientes funcionales en el contexto de una dieta saludable y, especialmente, atendiendo a un consumo en dosis realistas. Muchas de las evidencias científicas que avalan los efectos biológicos de alimentos ricos en fitoquímicos, inducido el cacao y sus productos derivados, proceden de estudios en los que las dosis proporcionadas superaban las que podrían obtenerse en el ámbito de ingestas habituales, por lo que los observados efectos en salud podrían no ser extrapolables a una situación real.

La introducción en la dieta de estos alimentos, cacao y café verde, ricos en fitoquímicos con propiedades beneficiosas en salud (fibra dietética, polifenoles y/o metilxantinas) o enriquecidos en estos compuestos, consumidos en dosis realistas en el marco de una dieta habitual, podría ejercer un efecto beneficioso en salud cardiovascular, especialmente en población en riesgo moderado de padecer este tipo de patología.

Para comprobar esta hipótesis y para proporcionar evidencias de la biodisponibilidad de las metilxantinas en estos alimentos, en la presente Tesis Doctoral se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1. Determinar la biodisponibilidad y metabolismo de metilxantinas en voluntarios sanos.**
 - 1.1. Estudio farmacocinético de absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas presentes en dos productos solubles de cacao: cacao normal y cacao enriquecido en metilxantinas.
 - 1.2. Estudio farmacocinético de absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas tras el consumo de un producto soluble de café mezcla tostado/verde.
- 2. Valorar el potencial efecto en función cardiovascular de dos productos solubles de cacao ricos en fibra dietética y en compuestos polifenólicos en sujetos sanos e hipercolesterolémicos.**
- 3. Establecer el efecto del consumo de una bebida soluble de café conteniendo café verde en parámetros cardiometabólicos en voluntarios sanos y en población de riesgo.**

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Productos de estudio, reactivos e instrumentación

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la biodisponibilidad de uno de los componentes bioactivos más comunes de nuestra dieta, las metilxantinas, tras el consumo por individuos sanos de dos de sus principales fuentes dietéticas, el cacao y el café, ricos también en compuestos polifenólicos. Así mismo, se ha estudiado el efecto en salud del consumo regular de dichos productos, tanto por individuos sanos como en una población con riesgo cardiovascular. Los distintos tipos de cacao y el café empleados se describen a continuación.

4.1.1. Cacao

Se han empleado distintos tipos de cacao, productos solubles en polvo que han sido elaborados y proporcionados por la empresa Nutrexpa, S.L. En el caso de los estudios de intervención crónica, los productos de cacao objeto de estudio fueron envasados por la empresa en sobres individuales monodosis sin etiquetar, con identificación como A y B para asegurar que el ensayo fuera ciego para los voluntarios. Cada sobre contenía la cantidad recomendada por el fabricante de cada tipo de producto. Los cacaos empleados en los estudios agudos fueron suministrados en envases de 400 g sin etiquetar, con la identificación C y D.

4.1.1.1. Estudios crónicos

➤ Producto de cacao rico en polifenoles (CC-PF)

Es un producto enriquecido en polifenoles del cacao con un bajo contenido en azúcar que está comercializado como Cola-Cao Light 0%. El producto fue envasado en sobres individuales de 7,5 g para ser disueltos en 200 mL de leche semidesnatada, según las recomendaciones del fabricante. Esta dosis reproduce una cantidad realista, que el consumidor probablemente tome, teniendo en cuenta que su mayor contenido en cacao le confiere un sabor concentrado.

El producto ha sido formulado empleando los edulcorantes acesulfamo, aspartamo y maltodextrina, de forma que el consumidor note las mínimas diferencias de sabor con respecto a otros productos de cacao de la misma casa comercial.

La composición de macronutrientes de este producto, proporcionada por la empresa, es la siguiente: 12,4% de proteínas (analizadas por método Kjeldahl), 0,6% de sacarosa (analizada por HPLC), 6,2% de grasa total, con un 57,4% de ácidos grasos saturados, 32% de monoinsaturados y 10,5% de poliinsaturados.

➤ Producto de cacao rico en fibra (CC-FD)

Es un producto enriquecido con fibra de cacao comercializado como Cola-Cao Fibra. La dosis de consumo recomendada de este producto es de 15 g disueltos en 200 mL de leche semidesnatada. Al igual que el producto anterior, está formulado para ser consumido sin necesidad de añadir azúcar. Este producto ha sido fabricado para aportar 2,5 g de fibra por cada ración, es decir, aproximadamente un 15% de la ingesta diaria recomendada (38 g/d para hombres y 25 g/d para mujeres, según Kassis y cols., 2009).

La composición de macronutrientes de este producto, proporcionada por la empresa, es la siguiente: 12% de proteínas (analizadas por método Kjeldahl), 34,4% de sacarosa (analizada por HPLC), 3,3% de grasa total, con un 58,0% de ácidos grasos saturados, 31,5% monoinsaturados y 10,5% de poliinsaturados.

4.1.1.2. Estudios agudos

➤ Producto de cacao control (CC)

Este producto presentaba un bajo contenido en azúcar. Se desconoce si este producto ha sido comercializado. La dosis administrada en el estudio de biodisponibilidad fue la recomendada por el fabricante: 15 g disueltos en 200 mL de leche semidesnatada. La empresa no ha facilitado los datos sobre la composición en macronutrientes de este producto.

➤ Producto de cacao rico en polifenoles y metilxantinas (CC-MX)

Este producto ha sido enriquecido en cacao y en nuez de cola, que le aportan un contenido extra de las metilxantinas teobromina, cafeína y teofilina y, por tanto, un incremento en las propiedades estimulantes del mismo. Se desconoce si este producto ha sido comercializado. La dosis de consumo administrada en el estudio de biodisponibilidad fue la recomendada por el fabricante: 25 g disueltos en 200 mL de

leche semidesnatada. La empresa no ha facilitado los datos sobre la composición en macronutrientes de este producto.

4.1.2. Café

Tanto para el estudio crónico sobre los efectos en salud del café, como para el estudio de biodisponibilidad, se ha empleado un producto mezcla de café verde (35%) y tostado (65%) (Nescafé Green Blend®) que ha sido comercializado por la empresa Nestle, S.L. Esta empresa proporcionó el café en sobres individuales sin etiquetar de 3,5 g que corresponden a dos cucharadas de postre rasas de café soluble y es la dosis recomendada por el fabricante para preparar una taza de café. La empresa no ha facilitado la composición nutricional de este producto, aunque ya se encuentra disponible en el mercado.

4.2. Reactivos

4.2.1. Análisis de alimentos

- Extracción y determinación de polifenoles y metilxantinas: hexano, metanol, ácido clorhídrico, ácido fórmico y acetona (Panreac, P.A.); acetonitrilo (Panreac, calidad HPLC); ácido gálico y tris-maleato (Sigma-Aldrich); carbonato sódico anhidro y reactivo de Folin-Ciocalteu's (Panreac, P.A.); catequina, epicatequina, procianidina B1 (Sigma-Aldrich), procianidina B2 (Extrasynthese). Cafeína y teofilina (Fluka); teobromina (Sigma-Aldrich).
- Determinación de fibra dietética: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, cloruro de calcio dihidratado, cloruro potásico, hidróxido sódico, acetona (Panreac, P.A.); pepsina (Merck, nº 7190); α -amilasa pancreática (A-3176), tampón Tris maleato (Sigma-Aldrich). Membranas de diálisis (peso molecular de corte 12.000-14.000 D, Dialysis Tubing Visking, Medicell International, Ltd.)
- Determinación de ácidos urónicos: ácido sulfúrico concentrado 96%, ácido acético y cloruro sódico (Panreac, P.A.); ácido bórico y 3-metilfenol (Merck); ácido galacturónico (Sigma-Aldrich).
- Determinación de azúcares neutros (método Antrona-Tiourea): ácido sulfúrico (Panreac, P.A.); antrona y glucosa (Merck); tiourea (Sigma-Aldrich).

- Determinación de la capacidad antioxidante en extractos polifenólicos de los alimentos:

- Ensayo ABTS: cloruro sódico, fosfato potásico dihidratado y fosfato sódico monohidratado (Panreac, P.A.); ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, ABTS), persulfato potásico y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich).
- Ensayo FRAP: ácido acético, ácido clorhídrico y tridloruro de hierro hexahidratado (Panreac, P.A.); fostafo sódico trihidrato (Merck); 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fluka); Trolox (Sigma-Aldrich).
- Ensayo ORAC: fosfato potásico dihidratado y fosfato sódico monohidratado (Panreac, P.A.); radical AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), Trolox y fluoresceína (Sigma-Aldrich); placas multiwell negras (BIOGEN).

4.2.2. Análisis de muestras biológicas

- Determinación de metilxantinas en plasma y orina: acetonitrilo y metanol (Panreac, P.A., calidad HPLC), ácidos perclórico y fórmico (Panreac, P.A.). Cafeína y teofilina (Fluka); teobromina, paraxantina, 1-metilxantina, 3-metilxantina, 7-metilxantina y los ácidos 1-metilúrico, 1,3-metilúrico, 1,7-metilúrico, 3,7-metilúrico (Sigma-Aldrich). Filtros de jeringa de acetato de celulosa (0,45 µm, Albet).

- Determinación de grupos carbonilo (GC) y proteínas: ácido clorhídrico, acetato de etilo, fosfato potásico dihidratado y etanol (Panreac, P.A.); ácido tricloroacético (Merck); reactivo Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, S.A., España); 2,4-dinitrofenilhidracina, γ-globulina y guanidina (Sigma-Aldrich).

- Determinación de malondialdehído (MDA): hidróxido sódico, ácidos sulfúrico, clorhídrico, perclórico y acético (Panreac, P.A.); 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) y 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) (Sigma-Aldrich); acetonitrilo (Panreac, calidad HPLC).

- Determinación de glucosa en suero empleando el kit colorimétrico Glucosa-TR de la casa comercial Spinreact.

- Determinación de biomarcadores de inflamación, moléculas de adhesión y citoquinas mediante la técnica Multiplex, empleando kits comerciales:

- Estudio crónico con cacao: kits de la casa comercial Merck-Millipore.
 - MILLIPLEX MAP High Sensitivity Human Cytokine kit: interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).
 - MILLIPLEX MAP Human Cardiovascular Disease kit: moléculas de adhesión intercelular (sICAM-1) y vascular (sVCAM-1), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1).
- Estudio crónico con café tostado/verde: kits de la casa comercial Bio-Rad.
 - Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay: interleuquina (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), interferón gamma (IFN- γ), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).
 - Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay: moléculas de adhesión intercelular (sICAM-1) y vascular (sVCAM-1) solubles.
 - Bio-Plex Pro Human Diabetes Assay: grelina, leptina, inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), resistina, visfatina e insulina.

4.3. Instrumentación

- Balanza Cobos precisión D-6000-SX y balanza AG104 Mettler Toledo (Barcelona, España). Baño termostático con agitación mecánica Memmert de Selecta (Barcelona, España).
- Centrífuga refrigerada Biofuge Primo R, Heraeus (IMLAB, Lille, Francia), centrífuga de tubos Eppendorf Microcentrifuge 5417 R (Eppendorf NA, Hamburg, Alemania) y centrífuga de placas Mini Shaker PSU-2T BIOSAN (Riga, Latvia).
- Concentrador de vacío Speedvac Savant SPD 131 DDA y trampa RVT4104 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU).
- Espectrofotómetros: termostatzado Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EEUU) y Perkin-Elmer Lambda 12 UV-Vis de doble haz (Überlingen, Alemania).

- Cromatógrafos de líquidos de alta resolución (HPLC): Equipos Agilent modelos 1100 y 1200 equipados cada uno con detector de diodo array (DAD), bomba cuaternaria, compartimento termostatzado para columna, desgasificador automático e inyector automático termostatzado con sistema Peltier. Software Agilent Chemstation (Agilent Technologies, Waldrom, Alemania).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector por espectrometría de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (HPLC-QTOF): Equipo Agilent 1200 con detector DAD acoplado a espectrómetro de masas Agilent QTOF Accurate Mass Q-TOF LCMS con fuente de ionización a presión atmosférica electrospray (ESI), tecnología JetStream y Software MassHunter Data Acquisition y Qualitative Analysis (Agilent Technologies, Waldrom, Alemania).
- Columnas cromatográficas: Nucleosil 120 RP-18 (125 X 4,0 mm, 5 µm) con pre-columna Lichrospher (4 x 4 mm) para la determinación de MDA; columna Superspher 100 RP-18 (250 x 4,6 mm, 4 µm) con pre-columna ODS RP-18 para la caracterización de polifenoles y metilxantinas en alimentos; columna Kinetex 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) con pre-columna AJO5768 C18 para la determinación de metilxantinas en muestras biológicas.
- Lectores de placas: multiplex Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex con software Bio-Plex Manager™ MP; lector multiplex Luminex-100/200 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA); lector de multiplacas BioTek (Winooski, VT, USA). Lavador magnético Bio-Plex Pro Wash Station (Winooski, VT, USA).
- Analizador segmental de composición corporal Tanita BC-418 MA con báscula digital Body Fat Monitor BF400 (OMRON), estadiómetro digital y lipocalibre Holtain, cinta antropométrica flexible modelo SECA 203, tensiómetro de brazo BS 150 Pic Indolor Diagnostic.
- Estufa Heraeus D6450 (Madrid, España); pHmetro D-501 Crison (Madrid, España); Sonicator Ultrasons –H, P, Selecta (Barcelona, España).

4.4. Caracterización de los productos objeto de estudio

4.4.1. Determinación de la humedad y grasa de los productos de cacao

La humedad se determinó en los 4 productos de cacao usados para los ensayos nutricionales. Para ello, se pesaron 0,5 g de producto y se secaron en estufa de aire a

100°C durante 12 horas. La humedad fue calculada por diferencia de peso antes y después del secado.

Para el análisis de la grasa en dichos productos, se pesaron 5 g de cacao y se extractaron con 15 mL de hexano con agitación orbital durante 30 minutos. Después la muestra fue centrifugada (15 min, 3000 g) y el residuo fue nuevamente extractado usando las mismas condiciones. Los sobrenadantes se combinaron y evaporaron en rotavapor para determinar la cantidad de grasa presente en la muestra. Los análisis se hicieron por triplicado, y los resultados de humedad y grasa se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Determinación de la humedad y la grasa en los productos de cacao (%).

	Cacao CC-PF	Cacao CC-FD	Cacao CC	Cacao CC-MX
Humedad	4,93 ± 0,46	3,68 ± 0,02	6,44 ± 0,07	6,33 ± 0,11
Grasa	6,56 ± 0,05	3,94 ± 0,05	5,51 ± 0,06	9,85 ± 0,03

Media ± SD (n= 6). CC-PF: cacao enriquecido en polifenoles; CC-FD: cacao enriquecido en fibra dietética; CC: cacao control; CC-MX: cacao enriquecido en polifenoles y metilxantinas.

4.4.2. Determinación de fibra dietética en los productos de cacao

El contenido de fibra dietética total (FD) de los productos de cacao se calculó como la suma de los valores de fibra soluble (FS) e insoluble (FI), que fueron analizadas tras hidrólisis enzimática y separación por diálisis de la fracción soluble (Saura-Calixto y cols., 2000).

Los productos desengrasados (0,3 g) eran sometidos a hidrólisis enzimática en 10 mL de tampón HCl-KCl pH 1,5 con 0,2 mL pepsina (300 mg pepsina/mL de HCl-KCl), incubando 1 h a 40°C en baño con agitación constante, seguido de hidrólisis con α -amilasa (1 mL, solución de 120 mg/mL de tampón Tris-maleato, pH 6,9) durante 16 h a 37°C. A continuación, las muestras se centrifugaron para separar la fracción soluble (sobrenadante) de la insoluble (pellet). La FS fue sometida a diálisis en agua corriente (caudal 7 L/h) durante 48 h a 25 °C y posteriormente hidrolizada con H₂SO₄ 1M (90 min, 100 °C) para determinar el contenido de ácidos urónicos (AU) y azúcares neutros (AN). El pellet (FI) fue lavado con acetona, centrifugado, secado durante 12 h a temperatura ambiente y sometido a hidrólisis ácida con H₂SO₄ 12M (1 h, 30 °C), seguida de hidrólisis con H₂SO₄ 1M (90 min, 100 °C). Tras centrifugar, en los sobrenadantes se determinaron

AN y AU. El residuo se secó a 105 °C para cuantificación gravimétrica del contenido de Lignina Klason (LK).

Los AN fueron determinados espectrofotométricamente (620 nm) en las fracciones FS y FI, empleando el reactivo antrona-tiourea y glucosa como patrón. Los AU se analizaron colorimétricamente en ambas fracciones usando ácido galacturónico como patrón (Scott, 1979) y midiendo la diferencia de absorbancias a 448 y 400 nm. Finalmente, la suma de AU y AN de la FS, junto con la suma de AU, AN y LK de la FI permitió conocer el contenido de FD. Las determinaciones se hicieron por triplicado, y los resultados son expresados como porcentaje de cada fracción por peso seco en la Tabla 9.

$$FD = FS + FI = (AN + AU) + (AN + AU + LK)$$

Tabla 9. Contenido en fibra dietética total como la suma de fibra insoluble y fibra soluble (% peso seco).

		Cacao CC-PF	Cacao CC-FD	Cacao CC	Cacao CC-MX
Fibra Soluble	AN	2,46 ± 0,43	0,69 ± 0,04	2,21 ± 0,51	1,80 ± 0,67
	AU	0,67 ± 0,16	0,99 ± 0,09	0,48 ± 0,19	1,20 ± 0,19
	Total	3,13	1,68	2,69	3,00
Fibra Insoluble	AN	10,49 ± 0,96	19,06 ± 1,60	13,32 ± 0,29	25,43 ± 2,39
	AU	1,47 ± 0,09	1,26 ± 0,07	0,99 ± 0,22	1,20 ± 0,15
	LK	9,81 ± 0,21	11,90 ± 0,28	11,86 ± 0,03	18,68 ± 0,26
	Total	21,77	32,22	25,18	45,31
Fibra Dietética Total		24,90	33,90	27,87	48,31

Media ± desviación estándar (n=3). AN: azúcares neutros; AU: ácidos urónicos; LK: Lignina Klason; CC-PF: cacao enriquecido en polifenoles; CC-FD: cacao enriquecido en fibra dietética; CC: cacao control; CC-MX: cacao enriquecido en polifenoles y metilxantinas.

4.4.3. Caracterización de polifenoles y metilxantinas

4.4.3.1. Extracción orgánica-ácida

Sobre 1 g de cada producto soluble de cacao, previamente desengrasado y secado en estufa de aire (60°C) durante 12 h, se añadieron 40 mL de metanol al 50% (v/v) en agua conteniendo 0,8% de ácido clorhídrico 2N. Tras 1 h de agitación orbital a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron (10 min, 3000 rpm) y se recogieron los sobrenadantes. Los residuos fueron nuevamente extractados con 40 mL de acetona al 70% (v/v) en agua durante 1 h con agitación, y posteriormente centrifugados. Los sobrenadantes de ambas extracciones se combinaron y enrasaron a 100 mL con una mezcla al 50% de las dos fases de extracción anteriormente indicadas (Bravo & Saura-Calixto, 1998). Las extracciones se hicieron por triplicado.

4.4.3.2. Caracterización de polifenoles

Para la determinación de polifenoles solubles totales en los extractos se siguió el método Folin-Ciocalteu (Montreau, 1972), basado en la reducción del reactivo Folin por agentes reductores, tales como los polifenoles, utilizando ácido gálico como patrón. Una alícuota de 0,5 mL de muestra o blanco (agua), así como de patrón a concentraciones comprendidas entre 0 y 400 ppm, se agitó con 0,5 mL de reactivo Folin durante 3 minutos. Seguidamente, se añadieron 10 mL de carbonato sódico (solución de 75 g/L, p/v) y se llevó a 25 mL con agua destilada, dejando la mezcla reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia del producto por colorimetría a 750 nm en un espectrofotómetro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 12 UV/V). El contenido en polifenoles se cuantificó como mg de ácido gálico/g de producto seco y desengrasado. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se muestran en la Tabla 10.

Para la identificación de polifenoles, 1 mL del extracto de cacao se evaporó a sequedad en concentrador de vacío Speedvac y se resuspendió en 200 µL de ácido fórmico al 1% (v/v) en agua Milli-Q (eluyente A). Los extractos concentrados se analizaron por HPLC con detector DAD siguiendo el método propuesto por el grupo (Martin y cols., 2008). La separación de analitos se llevó a cabo en una columna Superspher 100 RP-18 (250 x 4,6 mm, 4 µm, Merck) acoplada a una pre-columna ODS RP18. Una alícuota de 50 µL fue analizada con una fase móvil binaria de eluyente A y acetonitrilo (eluyente B) en un HPLC 1200 (Agilent) a 0,6 mL/min y 30 °C con la siguiente programación: inicialmente la fase móvil se programó con un 6% de eluyente B, que a los 20, 25, 30 y 40 min se modificó a un 10, 13, 15 y 10%, respectivamente, para

recuperar las condiciones iniciales a los 45 min, manteniéndolas durante 5 min más. Catequina, epicatequina y procianidinas B1 y B2 fueron identificadas a una longitud de onda de 280 nm y cuantificados empleando las rectas de calibrado de sus respectivos patrones, expresándose los resultados en mg/g de peso seco. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Cuantificación de polifenoles totales (mg GAE/g peso seco) y flavonoides (mg/g de peso seco) de los productos de cacao.

	Cacao CC-PF	Cacao CC-FD	Cacao CC	Cacao CC-MX
Polifenoles totales (mg GAE/g)	34,04 ± 2,28	15,75 ± 0,67	21,70 ± 1,40	25,63 ± 1,00
Flavonoides (mg/g)				
Epicatequina	1,26 ± 0,18	0,33 ± 0,09	0,57 ± 0,07	1,15 ± 0,06
Catequina	0,47 ± 0,03	0,26 ± 0,12	0,32 ± 0,03	0,53 ± 0,04
Procianidina B1	0,20 ± 0,04	n.d.	0,04 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Procianidina B2	1,09 ± 0,10	0,57 ± 0,11	0,39 ± 0,05	0,82 ± 0,06
Flavanoles totales	3,02	1,16	1,32	2,73

Media ± desviación estándar (n=3). GAE: equivalente de Ácido Gálico; n.d.: no detectado. CC-PF: cacao enriquecido en polifenoles; CC-FD: cacao enriquecido en fibra dietética; CC: cacao control; CC-MX: cacao enriquecido en polifenoles y metilxantinas.

El producto de café mezcla verde y tostado (Green Blend®) fue también analizado para conocer su composición polifenólica. Para ello, se preparó la bebida disolviendo 3,5 g de café soluble en 250 mL de agua caliente. La concentración de polifenoles totales en la infusión así preparada fue determinada por el método Folin-Ciocalteu descrito anteriormente.

Para la caracterización de polifenoles presentes en el café soluble tostado/verde, una alícuota se diluyó 1/3 en ácido fórmico al 1% (v/v) en agua y posteriormente se analizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Siguiendo las mismas condiciones de análisis utilizadas para el análisis cromatográfico de los productos de cacao (columna cromatográfica, fases móviles, temperatura y volumen de inyección), la separación se llevó a cabo en un sistema binario de ácido fórmico 1%, v/v (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) a 1 mL/min. Inicialmente, se eluyó con 90% de A, y a los 5, 35, 45 y 50 min la proporción de A fue del 80, 75, 65 y 65%, respectivamente, recuperando las condiciones iniciales a los 60 min y manteniéndolas durante 5 min. Los analitos se ionizaron en modo negativo y se cuantificaron empleando

como patrones los ácidos 5-cafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg/g de producto (Tabla 11).

Tabla 11. Cuantificación de polifenoles totales (mg GAE/g) y ácidos hidroxicinámicos (mg/g) de la bebida de café tostado/verde.

Café tostado/verde	
Polifenoles totales (mg GAE/g)	120,1 ± 0,09
Ácidos Hidroxicinámicos (mg/g)	
Ácido 3-cafeoilquínico	8,53 ± 0,20
Ácido 4-cafeoilquínico	10,54 ± 0,01
Ácido 5-cafeoilquínico	14,39 ± 0,05
Ácido 3-feruloilquínico	1,80 ± 0,05
Ácido 4-feruloilquínico	5,56 ± 0,27
Ácido 5-feruloilquínico	1,74 ± 0,06
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	2,01 ± 0,08
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	1,06 ± 0,06
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	1,62 ± 0,07
Ácidos hidroxicinámicos totales	47,24

Media ± desviación estándar (n=3). GAE: equivalente de Ácido Gálico.

4.4.3.3. Caracterización de metilxantinas

Para la determinación de metilxantinas se compararon diversos métodos de la bibliografía. El método de extracción orgánica a pH ácido usado para polifenoles de Bravo y Saura-Calixto (1998) fue comparado con un método de extracción en fase sólida (SPE) (Carlin-Sinclair y cols., 2009) y por extracción acuosa-orgánica (Ramli y cols., 2001). Para ello, se seleccionaron los productos que posteriormente se emplearían en el estudio de biodisponibilidad del cacao (CC y CC-MX). Éstos se sometieron a extracción con los 3 métodos propuestos por duplicado y los extractos fueron posteriormente analizados por HPLC siguiendo las mismas condiciones cromatográficas descritas para la identificación y cuantificación de polifenoles.

Para la cuantificación de metilxantinas se prepararon rectas de calibrado de los patrones cafeína, teobromina y teofilina en el rango de concentraciones 10,2-500 μ M. Los resultados, expresados en mg/g peso seco de producto, se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Comparación de tres métodos de extracción de metilxantinas en productos de cacao (mg/g de peso seco).

	Metilxantina	Cacao CC	Cacao CC-MX
Bravo y cols. (1998)	Teobromina	5,63 \pm 0,01	7,08 \pm 0,22
	Teofilina	n.d.	0,13 \pm 0,02
	Cafeína	0,66 \pm 0,01	3,03 \pm 0,28
	Total	6,29	10,24
Ramli y cols. (2001)	Teobromina	3,54 \pm 0,52	6,38 \pm 0,23
	Teofilina	n.d.	n.d.
	Cafeína	0,22 \pm 0,14	4,47 \pm 0,07
	Total	3,76	10,85
Carlin-Sinclair & Marc (2009)	Teobromina	5,34 \pm 0,26	7,38 \pm 0,11
	Teofilina	n.d.	n.d.
	Cafeína	0,27 \pm 0,06	1,74 \pm 0,12
	Total	5,61	9,12

Media \pm desviación estándar (n=2). n.d.: no detectado. CC: cacao control; CC-MX: cacao enriquecido en polifenoles y metilxantinas.

De los 3 métodos propuestos, la extracción orgánica-ácida mostró los mejores rendimientos permitiendo incluso la detección de teofilina, que no se consiguió con los otros métodos propuestos. Atendiendo a estos resultados, se llevó a cabo la extracción orgánica-ácida para analizar conjuntamente la composición de polifenoles y metilxantinas en los extractos de cacao, permitiendo una buena separación y resolución de los distintos compuestos en un único análisis cromatográfico. El contenido en metilxantinas del producto de café se evaluó en la infusión preparada a partir de 3,5 g en 250 mL de agua, utilizando las mismas condiciones cromatográficas empleadas para los extractos de cacao.

La Figura 12 muestra la separación e identificación de los polifenoles y metilxantinas en un extracto de cacao.

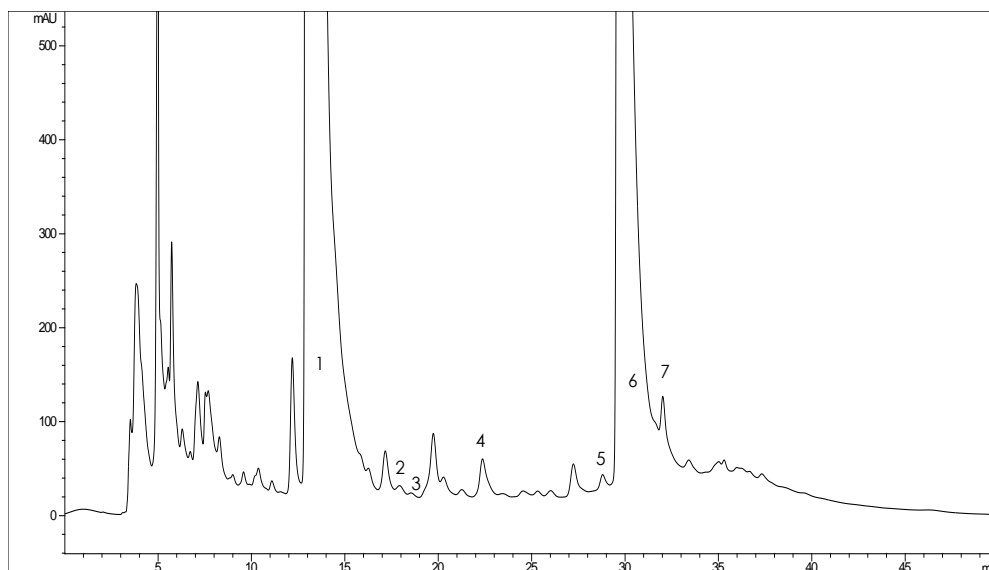


Figura 12. Cromatograma de un extracto de cacao para determinación de metilxantinas (1: teobromina, 2: teofilina, 6: cafeína) y polifenoles (3: procianidina B1, 4: catequina, 5: procianidina B2 y 7: epicatequina).

El contenido de metilxantinas en los extractos orgánicos-ácidos de las muestras de cacao CC-PF, CC-FD, CC y CC-MX, expresados como mg/g de peso seco, y en la infusión de café tostado/verde, expresados como mg/g, se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Determinación de metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) en los extractos de cacao (mg/g de peso seco) y en la infusión de café (mg/g).

	Cacao	Cacao	Cacao	Cacao	Café
	CC-PF	CC-FD	CC	CC-MX	tostado/verde
Cafeína	0,88 ± 0,08	0,51 ± 0,05	0,66 ± 0,06	3,03 ± 0,28	20,20 ± 1,79
Teobromina	6,43 ± 0,84	5,11 ± 0,14	5,63 ± 0,06	7,08 ± 0,22	0,034 ± 0,004
Teofilina	0,01 ± 0,01	n.d.	n.d.	0,13 ± 0,02	n.d.
Metilxantinas totales	7,32 ± 0,93	5,62 ± 0,19	6,29 ± 0,12	10,24 ± 0,52	20,23 ± 1,79

Media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado. CC-PF: cacao enriquecido en polifenoles; CC-FD: cacao enriquecido en fibra dietética; CC: cacao control; CC-MX: cacao enriquecido en polifenoles y metilxantinas.

4.4.4. Determinación de la capacidad antioxidante

El poder antioxidante de los productos de cacao y la infusión de café estudiados se determinó sobre los extractos orgánico-ácidos por 3 métodos diferentes: ORAC, FRAP y ABTS.

4.4.4.1. Ensayo ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity)

La determinación de la actividad antioxidante por la técnica ORAC está basada en la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína medida a 458 nm de excitación y 528 nm de emisión en presencia de antioxidantes (Huang y cols., 2002).

Previamente al análisis, los extractos de cacao se diluyeron a concentración 1/200, excepto el producto de cacao CC-PF y la bebida de café que necesitaron una mayor dilución (1/400 y 1/1000, respectivamente) debido a su mayor contenido en antioxidantes. Para la cuantificación se preparó una recta de calibrado usando Trolox como patrón a concentraciones comprendidas entre 6,25 y 50 μM . Muestras y patrones se diluyeron en una mezcla orgánica metanol:acetona:ácido clorhídrico 2N (proporciones 25:35:40, v/v/v) que fue además usada como blanco. Se dispensaron 25 μL de cada solución en placas multipocillo negras de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 125 μL de fluoresceína $8,25 \times 10^{-5}$ M a cada pocillo.

Para las medidas, se empleó un lector de multiplacas Bio-Tek termostatzado a 37 °C. Previo a la medida de fluorescencia, el radical AAPH (2,29-azobis (2-amidinopropano) dihidrodoruro) en concentración 75 mM (pH 7,4) fue añadido a las muestras, blancos y patrones como iniciador de la reacción oxidativa. A continuación, la caída de fluorescencia se registró en continuo durante 90 min y se cuantificó como el área bajo la curva (AUC). Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado y los resultados se expresaron como μmol de equivalentes Trolox (TE)/g de peso seco para los extractos de cacao y μmol de TE/g para la bebida de café (Tabla 14).

4.4.4.2. Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La capacidad de reducción de la especie hierro (III) a hierro (II) es otra medida de la capacidad antioxidante. El complejo de hierro con tripiridil s-triazina (TPTZ- Fe^{3+}), de color azul, en presencia de especies antioxidantes se reduce al complejo ferroso TPTZ- Fe^{2+} cambiando su color (Benzie & Strain, 1996).

Las muestras de cacao no precisaron dilución, mientras que para la bebida de café se trabajó con una dilución 1/50. El reactivo FRAP era preparado a diario mezclando 25 mL de tampón acetato 0,3 M (pH 3,6), 25 mL de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y 2,5 mL de tricloruro de hierro hexahidratado 20 mM. A 30 μ L de muestra, diluidos en 90 μ L de agua, se añadieron 900 μ L de reactivo FRAP. La determinación de la absorbancia a 595 nm se medía en un espectrofotómetro Beckman DU-640 termostatzado a 37 °C, empleando Trolox como patrón. La reacción se prolongó durante 30 minutos (Pulido y cols., 2000). Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como μ mol de TE/g de peso seco para los extractos de cacao y μ mol de TE/g para la bebida de café (Tabla 14).

4.4.4.3. Ensayo ABTS

El radical catiónico ABTS^+ es un cromóforo que absorbe a 730 nm. El ensayo conocido como ABTS cuantifica la capacidad de decoloración o disminución de la absorbancia cuando el radical interacciona con especies antioxidantes. El radical catión ABTS^+ reacciona con los antioxidantes presentes en la muestra problema y la reducción del radical (decoloración) es cuantificada por la disminución de la absorbancia (Re y cols., 1999).

Se diluyeron 38,4 mg de ABTS en 10 mL de persulfato potásico 2,45 mM para obtener una concentración final de 7,06 mM. La mezcla se agitó durante 12-16 h en ausencia de luz. El catión radical ABTS^+ así generado se diluyó con el mismo disolvente en el que se encontraba la muestra hasta observar una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$. Las muestras de cacao no necesitaron dilución para el análisis por ABTS, mientras que la bebida de café se diluyó a una concentración 1/20. A continuación, se mezclaron 0,1 mL de la muestra con 3,9 mL de reactivo ABTS^+ y la absorbancia se leyó a 730 nm durante 7 min. Para la cuantificación se preparó una recta de calibrado usando Trolox como patrón. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como μ mol de TE/g de peso seco para los extractos de cacao y μ mol de TE/g para la bebida de café (Tabla 14).

Tabla 14. Determinación de la capacidad antioxidante de los productos de estudio.

	Cacao CC-PF	Cacao CC-FD	Cacao CC	Cacao CC-MX	Café tostado/verde
	$\mu\text{mol TE/g peso seco}$				$\mu\text{mol TE/g}$
ORAC	459,71 \pm 9,40	234,51 \pm 4,89	248,56 \pm 4,32	257,39 \pm 5,79	3596,37 \pm 259,4
FRAP	175,07 \pm 1,52	75,88 \pm 2,61	109,41 \pm 2,33	120,12 \pm 3,26	1068,8 \pm 21,19
ABTS	133,09 \pm 3,70	56,64 \pm 3,26	66,64 \pm 6,88	89,53 \pm 2,99	674,39 \pm 11,59

Media \pm desviación estándar (n= 3 para FRAP y ABTS; n= 4 para ORAC). CC-PF: cacao enriquecido en polifenoles; CC-FD: cacao enriquecido en fibra dietética; CC: cacao control; CC-MX: cacao enriquecido en polifenoles y metilxantinas.

4.5. Ensayos clínicos de intervención

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han llevado a cabo cuatro estudios de intervención nutricional, que se detallan a continuación:

➤ Estudios de consumo agudo

- Estudio de la biodisponibilidad y metabolismo de metilxantinas presentes en productos solubles de cacao en voluntarios sanos (Estudio CACAO-BIO).
- Estudio de la biodisponibilidad y metabolismo de metilxantinas presentes en un producto soluble de café mezcla de verde y tostado en voluntarios sanos (Estudio CAFÉ-INFU-BIO).

➤ Estudios de consumo crónico

- Estudio del efecto en salud cardiovascular de productos solubles de cacao en voluntarios sanos y población de riesgo cardiovascular (Estudio CACAO-SALUD).
- Estudio del efecto en salud cardiovascular de café mezcla de verde y tostado en voluntarios sanos y población de riesgo cardiovascular (Estudio CAFÉ-INFU-SALUD).

Todos estos estudios se diseñaron teniendo en cuenta los principios de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta del Hierro (Madrid, España).

El reclutamiento de los voluntarios se llevó a cabo mediante anuncios y carteles en facultades, escuelas de idiomas y de formación profesional, centros deportivos municipales y centros médicos, e impartiendo breves charlas en las Facultades de Biología, Farmacia y Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Las personas interesadas en cada estudio asistieron a reuniones en las que recibieron información acerca de los objetivos, condiciones de participación, etc. Aquellos sujetos que decidieron participar tuvieron una entrevista con un miembro del equipo investigador en la que rellenaron un cuestionario previo proporcionando sus datos personales y respondiendo a algunas cuestiones de salud general. Con objeto de conocer mejor su estado de salud y comprobar si cumplían los criterios de inclusión, los voluntarios debían aportar una analítica de sangre reciente, o bien concertar una cita para someterse a un análisis de sangre rutinario en un laboratorio clínico. Una vez realizada la selección, los participantes firmaron el Consentimiento Informado y empezaron a formar parte del estudio.

Los datos proporcionados por los participantes en cada ensayo fueron recogidos en una ficha del voluntario a la que sólo tenían acceso dos miembros del equipo de investigación de acuerdo con la Ley de Protección de Datos 15/1999 (regulada en el Real Decreto 1720/2007). En dicha ficha se asignaba un código a cada participante, que se utilizó para designar sus muestras y cuestionarios durante todo el estudio.

4.5.1. Estudios de consumo agudo

Los criterios de inclusión generales para la participación en los estudios de biodisponibilidad fueron los siguientes:

- Hombres y mujeres sanos, de edad comprendida entre 18 y 55 años
- No padecer patología aguda o crónica ni estar sometidos a tratamiento farmacológico o haber tomado antibióticos en los 3 últimos meses
- No ser vegetarianos
- No ser fumadores
- En el caso de mujeres, no estar embarazadas
- No presentar un IMC > 25 kg/m²

Los voluntarios recibieron por escrito información detallada sobre los beneficios y posibles riesgos derivados del consumo de cada producto, así como instrucciones a seguir en los días previos a cada intervención. Se les proporcionó una lista de alimentos a restringir en los 3 días previos a cada intervención para reducir el consumo de alimentos ricos en los componentes bioactivos objeto de estudio. Con excepción de las restricciones indicadas, los voluntarios debían mantener sus hábitos dietéticos y de actividad física. Para asegurar el cumplimiento de las restricciones alimentarias, los voluntarios rellenaron un registro dietético de 72 horas donde recogieron de forma detallada los alimentos consumidos, sus cantidades y el modo de preparación empleado.

Tras un ayuno de 12 horas, los voluntarios se personaron en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) y un miembro del equipo los acompañó a la Unidad de Nutrición Humana (UNH), donde permanecieron bajo la supervisión de una enfermera cualificada y de un miembro del equipo de investigación.

Al inicio de la intervención, los sujetos eran tallados con un estadiómetro digital Holtain y pesados con una báscula BF400 Body Fat Monitor with scale (OMRON) y sus constantes fisiológicas cardiovasculares (presión arterial, PA, y frecuencia cardiaca, FC) eran medidas con un tensiómetro de brazo BS 150 Pic Indolor Diagnostic. A continuación, una enfermera les insertó un catéter en la vena cubital para extraer una muestra de sangre basal antes del consumo del producto objeto del estudio ($t=0$ h). La sangre se recogió en tubos BD Vacutainer® conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante. Unos minutos después de la primera extracción, los voluntarios tomaron la bebida objeto de estudio en un tiempo no superior a 5 min. Posteriormente, otras muestras sanguíneas fueron obtenidas a diferentes horas según se señala en cada estudio. Inmediatamente después de cada extracción, el plasma era separado por centrifugación (10 min, 1500 g, 4 °C), alicuotado en tubos eppendorf y conservado a -80 °C hasta su análisis. En paralelo, los voluntarios recogieron toda la orina que eliminaron antes del consumo de cada producto ($t=-2-0$ h) y a distintos intervalos de tiempo a lo largo de 24 h en botes de 1,5 litros conteniendo ácido ascórbico.

4.5.1.1. Estudio CACAO-BIO: Estudio de biodisponibilidad de polifenoles y metilxantinas de productos solubles de cacao en voluntarios sanos

El objetivo de este estudio era determinar la biodisponibilidad y metabolismo en humanos de polifenoles y metilxantinas presentes en los productos solubles de cacao CC y CC-MX. La biodisponibilidad de compuestos polifenólicos forma parte de otra Tesis Doctoral, por lo que en esta memoria se tratará únicamente lo relativo a la

biodisponibilidad y metabolismo de metilxantinas. Para ello se determinó la absorción plasmática y excreción urinaria de metilxantinas y sus metabolitos derivados por cromatografía líquida y espectrometría de masas.

Se llevó a cabo un estudio de intervención aleatorizado, controlado, cruzado y ciego en voluntarios sanos. De las personas interesadas en participar en el estudio, 14 dieron su consentimiento informado, pero 1 voluntario fue retirado del estudio por incumplimiento de las restricciones de alimentos previas a la intervención nutricional. Las 13 personas restantes se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos de 6 y 7 personas, y fueron citadas en días distintos. Las características de los participantes al inicio del estudio se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Características basales de los individuos que participaron en el estudio CACAO-BIO.

Estudio CACAO-BIO	Hombres (n=3)	Mujeres (n=10)
Edad (años)	26,67 ± 3,21	32,60 ± 9,85
Peso (kg)	75,60 ± 11,26	61,36 ± 9,61
IMC (kg/m²)	22,47 ± 2,97	23,36 ± 3,73
PA sistólica (mm Hg)	127,67 ± 9,61	121,88 ± 5,99
PA diastólica (mm Hg)	83,00 ± 9,54	77,00 ± 3,46
Frecuencia cardiaca (pulsaciones/min)	72,67 ± 15,18	69,56 ± 11,48

Media ± desviación estándar. IMC: índice de masa corporal; PA: presión arterial.

El estudio Cacao-Bio constaba de tres etapas separadas por intervalos de dos semanas: una etapa control en la que los voluntarios tomaron leche y dos etapas en las que consumieron dos productos de cacao, uno con un contenido natural en metilxantinas (CC) y otro enriquecido en metilxantinas (CC-MX). Las dosis de cacao administradas a los voluntarios se establecieron según las recomendaciones del fabricante, de forma que los voluntarios consumieron 15 g de cacao CC en una etapa y 25 g de cacao CC-MX en otra etapa, ambos disueltos en 200 mL de leche semidesnatada sin azúcar. En la etapa control los voluntarios consumieron 200 mL de leche semidesnatada igualmente sin azúcar.

Los 3 días previos a cada intervención se restringió el consumo de los siguientes alimentos ricos en polifenoles y metilxantinas: chocolate y productos derivados o

conteniendo cacao, café, zumos, té, vino, mosto, refrescos de cola, naranjas, mandarinas, manzanas, uvas, fresas, fresones u otros frutos del bosque, remolacha, cebolla, soja y derivados de soja.

Al inicio de cada intervención, los voluntarios eran pesados y tallados, y su presión arterial y frecuencia cardíaca eran determinadas por triplicado tras al menos 5 min de reposo (Tabla 15). Una enfermera insertó una vía intravenosa en la vena cubital del brazo no predominante, tomando muestras de sangre basal (t=0), y posteriormente a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 h tras beber la bebida correspondiente. A las 2, 4 y 8 h, los voluntarios recibieron un desayuno, almuerzo y merienda, respectivamente, libres de polifenoles y metilxantinas, así como agua y bebidas isotónicas a demanda. En los días de intervención, los voluntarios recogieron la orina en condiciones basales (t=-2-0h) y a los intervalos de tiempo 0-4, 4-8, 8-12 y 12-24 h. Pasadas 8 h desde el inicio de la intervención, los voluntarios abandonaron la UNH del ICTAN y volvieron al día siguiente para entregar las orinas correspondientes a los 2 últimos intervalos. La Figura 13 muestra un esquema de una etapa de intervención y los tiempos de muestreo.

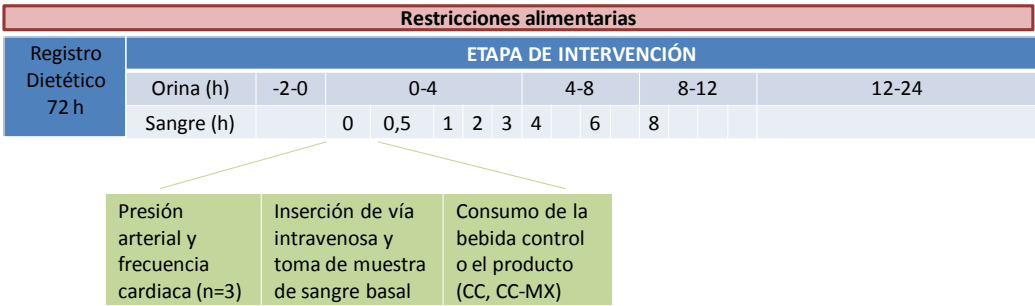


Figura 13. Esquema correspondiente a una etapa del estudio de biodisponibilidad CACAO-BIO.

4.5.1.2. Estudio CAFÉ-INFU-BIO: Estudio de biodisponibilidad de ácidos hidroxicinámicos y metilxantinas presentes en café tostado/verde en voluntarios sanos

El objetivo general del estudio Café-Infu-Bio era determinar la biodisponibilidad de los polifenoles y metilxantinas presentes en un producto soluble de café mezda tostado/verde. Como en el estudio anterior, los resultados referentes a los compuestos polifenólicos no serán presentados en esta Tesis.

Se llevó a cabo un estudio en 12 voluntarios sanos que dieron su consentimiento informado antes de empezar, completando todos ellos el estudio con éxito. Los voluntarios se distribuyeron en 2 grupos de 6 individuos cada uno. La Tabla 16 muestra las características basales de los participantes.

Tabla 16. Características basales de los individuos que participan en el estudio de biodisponibilidad CAFÉ-INFU-BIO.

Estudio Café-Infu-Bio	Hombres (n=7)	Mujeres (n=5)
Edad (años)	27,86 ± 3,48	28,88 ± 3,56
Peso (kg)	68,43 ± 9,96	66,00 ± 13,27
IMC (kg/m²)	23,42 ± 2,52	22,43 ± 3,33
PA sistólica (mm Hg)	124,60 ± 8,20	121,14 ± 16,01
PA diastólica (mm Hg)	76,40 ± 5,50	74,29 ± 11,80
Frecuencia cardíaca (pulsaciones/min)	62,60 ± 8,79	75,43 ± 4,76

Media ± desviación estándar. IMC: índice de masa corporal; PA: presión arterial.

El estudio Café-Infu-Bio constaba de una única etapa en la que los voluntarios consumieron 3,5 g de la mezcla de café verde y tostado (35:65, p/p) disueltos en 200 mL de agua caliente.

Los 3 días previos a la intervención, el consumo de los siguientes alimentos ricos en polifenoles y metilxantinas se prohibió: cacao, café, té, vino y productos derivados, así como refrescos de cola. Otros alimentos fueron restringidos, tales como frutas, zumos, legumbres, aceite, vinagre, frutos secos, productos integrales y verduras, con excepción de plátano, sandía, melón y patatas.

Al inicio de la intervención, se pesó y talló a los voluntarios, midiendo la presión arterial y la frecuencia cardíaca por triplicado tras al menos 5 min de reposo (Tabla 16). Igualmente, una vez que la enfermera hubo insertado la vía intravenosa en la vena cubital del brazo no dominante, se realizaron extracciones sanguíneas en condiciones basales (t= 0) y a las 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 12 h tras la ingesta del café. La orina se recogió durante los intervalos de tiempo -2-0 (basal), 0-2, 2-5, 5-8, 8-12 y 12-24 h. Durante la intervención, se proporcionaron agua y bebidas isotónicas a demanda, así como un desayuno, almuerzo y merienda libres de polifenoles y metilxantinas a las 2, 6 y 10 horas, respectivamente. Los voluntarios permanecieron en la UNH del ICTAN durante

las primeras 12 h de la intervención y regresaron al día siguiente para entregar la orina correspondiente al último intervalo. La Figura 14 muestra un esquema general del estudio, indicando los tiempos de muestreo.

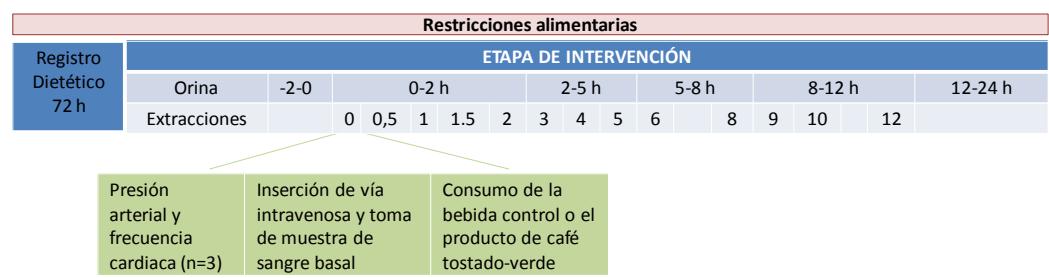


Figura 14. Esquema del estudio de biodisponibilidad CAFÉ-INFU-BIO.

4.5.2. Estudios de consumo crónico

Los criterios de inclusión generales para la participación en los estudios crónicos se resumen a continuación:

- Adultos sanos, hombres y mujeres, de edad comprendida entre 18 y 55 años
- Niveles de colesterol total en sangre menor de 200 mg/dL en el grupo control y entre 200 y 240 mg/dL en el grupo de riesgo
- No padecer patología aguda o crónica
- No padecer ninguna de las siguientes enfermedades gastrointestinales: síndrome de intestino irritable, enfermedad de Crohn, diverticulosis, colon espástico, colitis ulcerosa, inflamación intestinal crónica, estreñimiento crónico, diarrea, hemorroides
- No estar sometidos a tratamiento farmacológico o haber tomado antibióticos en los 3 últimos meses
- No tomar suplementos dietéticos (fibra, polen o jalea real, complejos vitamínicos o minerales, etc.)
- No ser vegetarianos

- No ser fumadores
- En el caso de mujeres, no estar embarazadas
- No presentar un IMC > 25 kg/m²

Antes del inicio de cada estudio crónico, el tamaño muestral se calculó estadísticamente tomando el colesterol total como variable principal. Considerando un poder estadístico del 80% para detectar cambios del orden de 60 mg/L con un nivel de significancia de 0,05 y asumiendo una desviación estándar intra-individual de 10, se determinó que el número mínimo de voluntarios para cada estudio debía de ser 46.

Los voluntarios recibieron por escrito información detallada sobre las pautas de consumo del producto objeto de estudio, así como las instrucciones a seguir en los días de intervención y los días previos a la misma. Se proporcionó a los voluntarios una lista de alimentos prohibidos y restringidos durante cada estudio, para reducir la ingesta de alimentos ricos en los componentes bioactivos de interés, junto con otro listado de alimentos recomendados con objeto de mantener un equilibrio nutricional (Anexo 1). Con excepción de estas restricciones, los voluntarios debían mantener sus hábitos dietéticos y de actividad física habituales. Junto a la documentación citada, los voluntarios recibieron un registro dietético de 72 h, un cuestionario de actividad física y una hoja de observaciones para que anotasen cualquier irregularidad (enfermedades, viajes, posibles incumplimientos, etc.). Todos estos cuestionarios debían ser rellenados en las distintas etapas de cada estudio. Adicionalmente, se les proporcionó un calendario en el que se les indicaban las fechas en que se les citaba para que se presentaran en ayunas en las instalaciones del ICTAN.

Los días de intervención, los voluntarios entregaban la orina de la primera micción de la mañana (-2-0 h) en botes estériles conteniendo ácido ascórbico. A continuación, dos miembros del equipo investigador les acompañaban al laboratorio de extracciones de la Escuela de Análisis Clínicos (Facultad de Farmacia, UCM, Madrid) o de la UNH del ICTAN. Después de un reposo de al menos 5 minutos se midió la PA y FC por triplicado, dejando un espacio de 3 minutos entre cada medida. Seguidamente, un profesional sanitario llevaba a cabo las extracciones de sangre. Posteriormente, los voluntarios eran acompañados al Laboratorio de Nutrición Aplicada de la Facultad de Farmacia (UCM, Madrid), donde se llevaba a cabo el estudio antropométrico que se detallará más adelante. Finalmente, los voluntarios recibían el producto a estudiar en sobres monodosis y en cantidad suficiente para cubrir toda la etapa de intervención.

Las muestras de sangre se recogían en tubos BD Vacutainer®, que contienen un gel activador de la coagulación (Ref. 368968) para la separación del suero sanguíneo o con anticoagulante EDTA para la obtención del plasma (Ref. 367864). El plasma era inmediatamente separado de la sangre por centrifugación (10 min, 1500 g, 4 °C) y

posteriormente alicuotado en tubos eppendorf que se congelaron a -80 °C para futuros análisis. Las muestras de sangre extraídas para obtener suero eran mantenidas 30 min a temperatura ambiente, centrifugadas (10 min, 1500 g, 4 °C) y almacenadas de la misma manera. De las muestras de suero y plasma recién separadas, una parte era inmediatamente transportada a un laboratorio de análisis para realizar diversas determinaciones bioquímicas y hematológicas.

4.5.2.1. Estudio CACAO-SALUD. Estudio del efecto en salud cardiovascular de productos solubles de cacao. Evaluación en voluntarios sanos y población con riesgo cardiovascular

El objetivo principal de este estudio era evaluar el efecto del consumo regular de dos productos solubles de cacao en la función cardiovascular, tanto en población sana como en una población susceptible de riesgo cardiovascular. Con este fin, se llevó a cabo la evaluación en sangre de diversos parámetros de riesgo cardiovascular (perfil lipídico, PA y FC, entre otros) y biomarcadores de inflamación (moléculas de adhesión y citoquinas). Adicionalmente, se valoró el estado redox de los voluntarios mediante la medida de capacidad antioxidante en suero por los ensayos ORAC, FRAP y ABTS, así como el daño oxidativo a lípidos (MDA) y proteínas (GC). Así mismo, se llevó a cabo un estudio antropométrico mediante la valoración de la densidad corporal y otros parámetros según se detalla en el Apartado 4.

Se llevó a cabo un estudio cruzado y controlado, aleatorizado durante las dos primeras fases, en 50 individuos, sanos e hipercolesterolémicos. Por razones personales, 6 de ellos abandonaron el estudio y los restantes 44 lo completaron con éxito. Las características de los voluntarios al inicio del estudio se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17. Características basales de los participantes en el estudio CACAO-SALUD.

	Normocolesterolémicos (n=24)		Hipercolesterolémicos (n=20)	
	Hombres (n=11)	Mujeres (n=13)	Hombres (n=9)	Mujeres (n=11)
Edad (años)	28,1 ± 7,9	26,1 ± 6,1	35,7 ± 11,2	25,4 ± 6,8
Peso (kg)	75,2 ± 10,6	60,3 ± 7,7	81,0 ± 14,9	58,8 ± 5,5
IMC (kg/m²)	24,1 ± 3,6	22,0 ± 2,6	26,2 ± 4,2	22,4 ± 2,3
PA sistólica (mm Hg)	117,4 ± 10,2	115,1 ± 9,1	122,9 ± 15,3	118,9 ± 10,4
PA diastólica (mm Hg)	71,8 ± 8,0	72,8 ± 8,4	79,8 ± 10,3	73,9 ± 8,4
FC (pulsaciones/min)	65,1 ± 10,1	69,1 ± 9,8	63,8 ± 9,5	82,2 ± 8,2

Media ± desviación estándar. IMC: índice de masa corporal; PA: presión arterial; FC: frecuencia cardíaca.

Los productos estudiados en este ensayo fueron el cacao rico en polifenoles (CC-PF) y el cacao rico en fibra dietética (CC-FD). Al inicio del estudio, en la Etapa Basal o *Run-in*, los voluntarios se adaptaron durante dos semanas a las restricciones alimentarias. A continuación, los voluntarios se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos. Uno de los grupos comenzó consumiendo durante 4 semanas 2 vasos diarios de 200 mL de leche semidesnatada (Etapa Control) mientras el otro grupo consumía el producto de cacao CC-FD. Tras un lavado de 2 semanas, los voluntarios consumieron el otro producto (leche o CC-FD). Tras un segundo lavado de 2 semanas, todos los voluntarios consumieron el producto CC-PF durante 4 semanas. En las etapas de intervención con cacao, los voluntarios consumían 2 raciones diarias de uno u otro producto de cacao, preferentemente en el desayuno y la merienda, disueltos en 200 mL de leche semidesnatada. Durante las etapas de lavado, los sujetos consumían dos vasos de 200 mL de leche semidesnatada en el desayuno y la merienda.

Todos los cuadernillos y cuestionarios serán explicados con detalle en el Apartado 5. En la Figura 15 se muestra un esquema del estudio CACAO-SALUD.

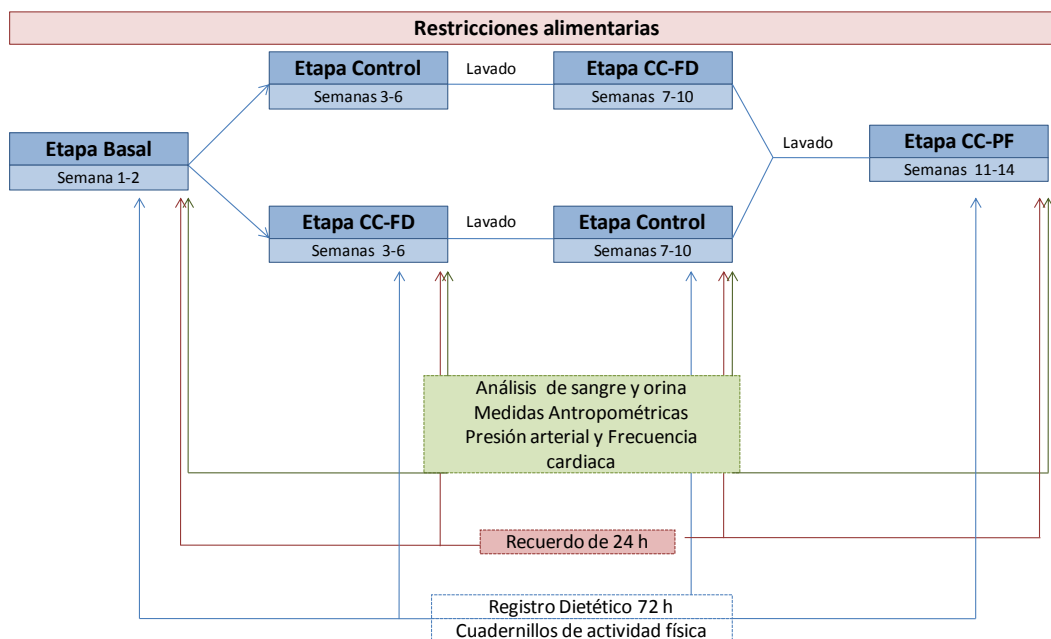


Figura 15. Esquema general del estudio de consumo crónico con cacao (Estudio CACAO-SALUD). CC-FD: cacao enriquecido en fibra dietética, CC-PF: cacao enriquecido en polifenoles.

4.5.2.2. Estudio CAFÉ-INFU-SALUD. Valoración del potencial efecto en función cardiovascular del café tostado/verde en voluntarios sanos y población con riesgo cardiovascular

El objetivo general de este estudio era valorar el efecto en función cardiovascular derivado del consumo regular de un producto de café tostado/verde en población sana y en riesgo cardiovascular. Con este fin, se evaluaron diversos parámetros bioquímicos y hematológicos (ver Apartado 7) de riesgo cardiovascular, tales como el perfil lipídico, PA y FC. También se estudió el posible efecto anti-inflamatorio del producto de estudio mediante la determinación de los niveles plasmáticos de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, así como moléculas de adhesión. Adicionalmente, se determinaron los efectos sobre diversas hormonas. Además, se determinó el estado antioxidante de los voluntarios por los ensayos ORAC, FRAP y ABTS, y el daño oxidativo a lípidos (MDA) y proteínas (GC), así como la influencia sobre la glicemia y la resistencia a la insulina. Igualmente, se llevó a cabo la valoración antropométrica detallada en el Apartado 4.

Para abordar los objetivos anteriores se realizó un estudio cruzado, aleatorizado y controlado en voluntarios sanos e hipercolesterolémicos. De los 54 voluntarios que dieron su consentimiento firmado para participar, 2 voluntarios abandonaron el estudio y el resto lo completaron satisfactoriamente (Tabla 18).

Tabla 18. Características basales de los participantes en el estudio CAFÉ-INFU-SALUD.

	Normocolesterolémicos (n=25)		Hipercolesterolémicos (n=27)	
	Hombres (n=10)	Mujeres (n=15)	Hombres (n=10)	Mujeres (n=17)
Edad (años)	24,7 ± 5,8	26,6 ± 7,7	34,8 ± 9,2	33,3 ± 10,2
Peso (kg)	76,8 ± 13,4	57,6 ± 7,0	78,2 ± 7,7	56,7 ± 7,6
IMC (kg/m²)	24,2 ± 2,8	21,9 ± 2,5	24,9 ± 2,3	21,4 ± 2,5
PA sistólica (mm Hg)	123,1 ± 8,3	107,8 ± 8,3	128,8 ± 9,4	111,5 ± 10,6
PA diastólica (mm Hg)	74,2 ± 6,2	67,6 ± 5,5	83,1 ± 8,8	71,3 ± 8,2
FC (pulsaciones/min)	62,7 ± 8,3	72,4 ± 10,3	64,3 ± 9,6	71,6 ± 6,7

Media ± desviación estándar. IMC: índice de masa corporal; PA: presión arterial; FC: frecuencia cardíaca.

El producto estudiado en este ensayo fue una mezcla soluble de café verde y tostado (35:65, p/p) (Café Green Blend®). El estudio duró 20 semanas distribuidas en 4 etapas. En la Etapa Basal o *Run-in* (2 semanas) los voluntarios se adecuaron a las restricciones dietéticas del estudio. A continuación, tanto los voluntarios normocolesterolémicos como los hipercolesterolémicos se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos. Uno de los grupos comenzó con la etapa de intervención o Etapa Café (8 semanas), en la que consumieron diariamente tres tazas de café tostado/verde preparadas disolviendo un sobre de 3,5 g en 250 mL de agua caliente, preferiblemente en el desayuno, media mañana y merienda, mientras que el otro grupo consumió agua, una bebida isotónica o similar, libre de polifenoles y metilxantinas, con la misma pauta de consumo que con el café durante la Etapa Control (8 semanas). Tras un lavado (2 semanas), los voluntarios que inicialmente habían consumido café pasarían a consumir la bebida control durante 8 semanas, mientras que los voluntarios que se iniciaron en la Etapa Control pasarían a consumir el producto de café siguiendo las pautas de consumo indicadas. La Figura 16 muestra un esquema del estudio.

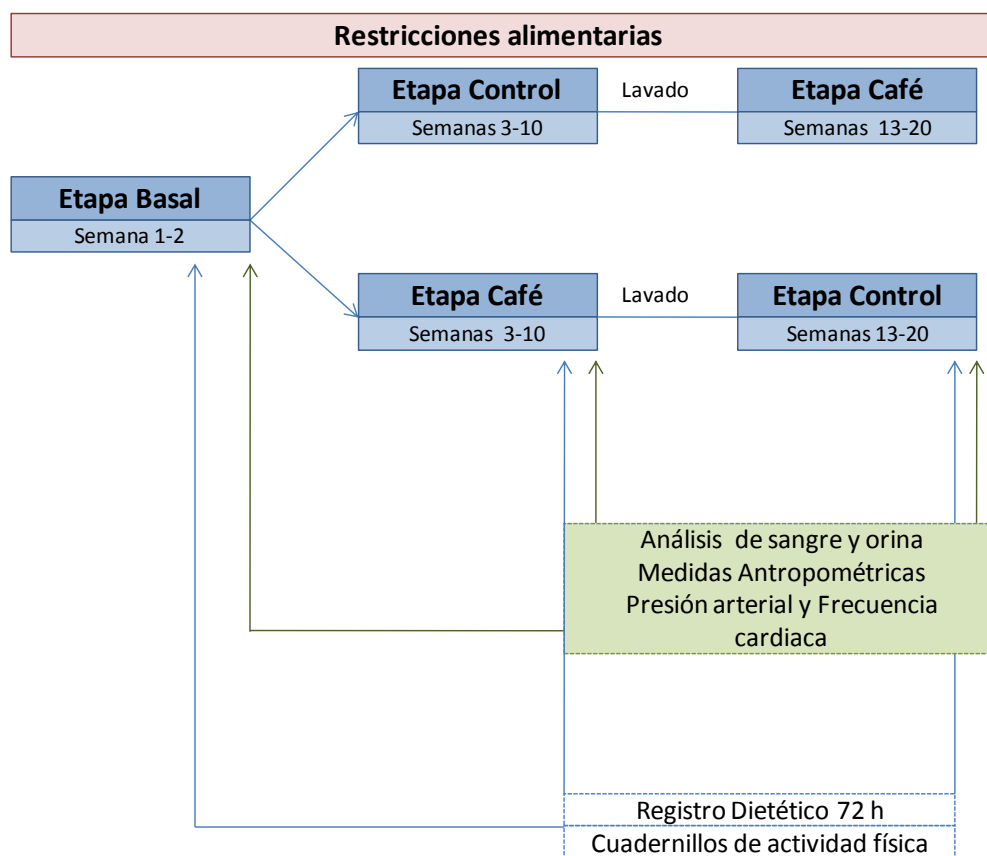


Figura 16. Esquema general del estudio de consumo crónico con café tostado/verde (Estudio CAFÉ-INFU-SALUD).

4.6. Medidas antropométricas

Con objeto de conocer el efecto del consumo prolongado de los distintos productos objeto de estudio sobre la composición corporal y comparar el resultado con la situación basal, al final de cada una de las etapas de los estudios crónicos se llevó a cabo la valoración de diversos parámetros antropométricos. Las medidas y el análisis de resultados se realizaron en colaboración con antropometristas del Laboratorio de Nutrición Aplicada de la Facultad de Farmacia (UCM, Madrid).

El compartimento graso se estimó a partir de los valores de distintas constantes antropométricas. El porcentaje de grasa corporal se determinó por bioimpedancia eléctrica tetrapolar monofrecuencia usando un analizador segmental de composición

corporal Tanita BC-418 MA con báscula digital incluida. Se utilizó un estadiómetro digital Holtain para determinar la estatura de los voluntarios. A partir de los datos obtenidos de peso y talla se calculó el IMC de acuerdo a la fórmula:

$$\text{IMC} = \text{peso}/(\text{altura})^2$$

expresando los resultados como kg/m².

Los perímetros corporales (braquial, cintura, abdominal, cadera y muslo) fueron medidos con una cinta antropométrica flexible modelo SECA 203. Los pliegues cutáneos tricipital y subescapular fueron determinados usando un lipocalibre Holtain. Estos datos permitieron el cálculo matemático de la densidad corporal con la fórmula de Durnin y Womersley (1974):

$$\text{Densidad} = c - [m \times \text{Log} (\text{tricipital} + \text{subescapular})]$$

donde c y m son dos constantes establecidas a partir de los pliegues cutáneos y la edad.

El porcentaje de grasa corporal se estimó a partir de los datos de densidad corporal (D) de acuerdo a la fórmula de Siri y cols. (1961):

$$\% G = [(4,95/D) - 4,50] \times 100$$

4.7. Cuestionarios

4.7.1. Cuestionario de actividad física

En los estudios crónicos, los voluntarios debían mantener su actividad física habitual a lo largo de toda la intervención. Con objeto de conocer su gasto energético diario, los voluntarios rellenaron el cuestionario simplificado de Actividad Física y Tiempo Libre de Minnesota (Elosua y cols., 2000) al final de cada etapa del estudio Cacao-Salud, mientras que para el estudio Café-Infu-Salud la actividad física fue evaluada con el cuestionario proporcionado por el programa Alimentación, Dieta y Nutrición (ADN) del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia (UCM, Madrid). Aquellos cuestionarios en los que el gasto energético total era un 30% superior o inferior a la ingesta calórica y que además no suponían variación significativa en el

compartimento graso fueron desestimados. Ambos cuestionarios consideraban el tiempo y la intensidad de las actividades de trabajo, deporte y ocio.

4.7.2. Cuestionarios dietéticos

En los estudios de consumo crónico y agudo, los voluntarios debían mantener sus hábitos dietéticos con algunas restricciones alimentarias. Las evaluaciones nutricionales eran controladas mediante registros dietéticos de 72 horas. Los voluntarios recibieron instrucciones para rellenar dichos registros durante 3 días consecutivos de la última semana de cada etapa de los estudios crónicos, o en los 3 días previos a cada etapa de los estudios agudos. Ingredientes, raciones, cantidades y forma de cocinado de los alimentos, así como aderezos y condimentos utilizados, debían ser detallados en la medida de lo posible, incluyendo si fuera preciso el etiquetado de alimentos.

Adicionalmente, en el estudio Cacao-Salud los voluntarios rellenaron el día previo a cada intervención un recuerdo de 24 horas en el que registraron las ingestas siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente con objeto de controlar la ingesta de alimentos previa a las analíticas.

La ingesta energética, así como la de los distintos componentes de los alimentos consumidos, se evaluaron con el programa DIAL del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia (UCM, Madrid). La ingesta de polifenoles de la dieta se evaluó usando el programa www.phenol-explorer.eu que ofrece una estimación de la composición fenólica por el método Folin-Ciocalteu.

4.8. Determinación de metilxantinas en muestras biológicas

4.8.1. Extracción de metilxantinas de plasma y orina

Se llevaron a cabo estudios de biodisponibilidad de metilxantinas en humanos con alimentos que naturalmente contienen estos compuestos (cacao CC y café tostado/verde) así como alimentos enriquecidos en metilxantinas (cacao CC-MX).

Tras revisar la bibliografía sobre la determinación de metilxantinas en sangre, se decidió estudiar comparativamente los métodos de extracción de Schreiber-Deturmeny y Bruguerolle (1996) y de Mumford y cols. (1996), basados ambos en la separación de los analitos por precipitación de las proteínas. El primero de ellos dio mejores resultados

y finalmente se empleó para la extracción de metilxantinas en plasma con algunas modificaciones: 100 μL de plasma fueron acidificados con 40 μL de ácido perclórico al 20% (v/v). Las muestras eran agitadas en agitador vortex y centrifugadas (10 min, 10500 rpm, 4°C) y 25 μL del sobrenadante eran directamente analizados por HPLC.

Para la determinación de metilxantinas en orina, se valoró emplear técnicas de precipitación (Schneider y cols., 2003) o SPE (Thevis y cols., 2004; Zydron y cols., 2004), aunque en la actualidad se defiende el análisis de estos componentes en orina sin pre-tratamiento (Llorach y cols., 2009). Tras probar los distintos métodos, finalmente se analizaron las metilxantinas en orina sin pre-tratamiento. Tras centrifugar las muestras (10 min, 12500 rpm, 4°C), los sobrenadantes se filtraron por filtros de jeringa membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm (Albet), y una alícuota de 25 μL se analizó directamente por HPLC.

4.8.2. Análisis e identificación de metilxantinas

La identificación y cuantificación de metilxantinas en plasma y orina fue llevada a cabo por HPLC con detección UV (DAD) y/o espectrometría de masas (cuadrupolo de tiempo de vuelo, Q-TOF). La Tabla 19 resume los analitos estudiados, así como algunas de sus propiedades físico-químicas.

Para la identificación y posterior cuantificación de metilxantinas y ácidos metilúricos en las muestras biológicas, se prepararon curvas de calibrado de cada uno de los analitos en concentraciones comprendidas entre 0,36 y 45,5 μM . Todos los analitos se diluían en agua bidestilada, con excepción del ácido 1-metilúrico que necesitó un 10% de metanol para su completa disolución. La falta de un patrón comercial del ácido 1,3,7-metilúrico hizo que este metabolito se cuantificara como equivalentes de su precursor, la cafeína. Los ácidos 3-metilúrico y 7-metilúrico no se identificaron en las muestras de acuerdo a los resultados encontrados en la bibliografía.

Tabla 19. Características físico-químicas de las metilxantinas y ácidos metilúricos.

Metabolito	Nombre común	λ_{\max} (nm)	Fórmula molecular	Masa molecular
Monometilxantinas	1-metilxantina (1-MX)	272	$C_6H_6O_2N_4$	166.0491
	3- metilxantina (3-MX)	272	$C_6H_6O_2N_4$	166.0491
	7- metilxantina (7-MX)	272	$C_6H_6O_2N_4$	166.0491
Dimetilxantinas	Paraxantina (PX)	272	$C_7H_8O_2N_4$	180.0647
	Teobromina (TB)	272	$C_7H_8O_2N_4$	180.0647
	Teofilina (TP)	272	$C_7H_8O_2N_4$	180.0647
Trimetilxantina	Cafeína (CF)	272	$C_8H_{10}O_2N_4$	194.0804
Ácido monometilúrico	1-metilúrico (1-MU)	289	$C_6H_6O_3N_4$	182.0440
Ácidos dimetilúricos	1,3-metilúrico (1,3-MU)	289	$C_7H_8O_3N_4$	196.0596
	1,7-metilúrico (1,7-MU)	289	$C_7H_8O_3N_4$	196.0596
	3,7-metilúrico (3,7-MU)	289	$C_7H_8O_3N_4$	196.0596
Ácido trimetilúrico	1,3,7-metilúrico (1,3,7-MU)	289	$C_8H_{10}O_3N_4$	210.0753

Las muestras de plasma, tratadas según lo especificado en el Apartado 6.1, se analizaron en un equipo HPLC serie 1200 (Agilent Technologies), consistente en un automuestreador y compartimento de columna termostatizados, bomba cuaternaria y detector DAD, manteniendo la temperatura a 25 °C durante los análisis (Figura 17). Tras evaluar la separación de los analitos con diferentes columnas cromatográficas, finalmente la mejor resolución se consiguió con la columna Kinetex 100 C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m, Phenomenex) acoplada a una pre-columna AJO5768 C18 con holder AJO-9000.

Los analitos se eluyeron con una fase móvil ternaria de ácido fórmico al 1% en agua bidestilada (eluyente A), metanol (eluyente B) y acetonitrilo (eluyente C) a un caudal constante de 0,7 mL/min. La fase móvil fue inicialmente programada con 99% de eluyente A y 1% de B, y a los 2, 30, 33, 38 y 40 min las proporciones de A:B:C fueron las siguientes: 95:4,5:1,5, 90:9:1, 85:3,5:1,5, 65:31,5:3,5, 0:90:10. Al final del programa se recuperaron y mantuvieron las condiciones iniciales durante 10 min. Los cromatogramas se registraron a las máximas longitudes de onda de metilxantinas y ácidos metilúricos (272 y 289 nm, respectivamente) y la identificación se llevó a cabo por comparación con

los tiempos de retención y los espectros UV de los patrones. De esta forma, el método cromatográfico permitía la separación de 12 metilxantinas y ácidos metilúricos con una buena resolución y sin interferencias. Las muestras fueron analizadas por duplicado, y los resultados expresados en unidades de concentración μM .



Figura 17. Equipo HPLC-DAD-ESI-QTOF serie 1200 Agilent (Agilent Technologies) ubicado en la Unidad de Técnicas Analíticas (USTA) del ICTAN.

Debido a la mayor dificultad para identificar los analitos presentes en orina, se realizó un primer análisis por espectrometría de masas para comprobar los tiempos de retención de cada analito y, además, identificar el ácido 1,3,7-metilúrico. Para ello, se emplearon las condiciones cromatográficas descritas arriba en un HPLC-DAD 1200 (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF con fuente de ionización por electrospray (ESI) programado según las condiciones descritas en la Tabla 20. El software MassHunter Workstation fue usado para la adquisición y tratamiento de datos. Los análisis por espectrometría de masas se llevaron a cabo en la Unidad de Servicio de Técnicas Analíticas (USTA) del ICTAN.

Tabla 20. Condiciones empleadas para el análisis por espectrometría de masas Q-TOF.

Modo de ionización	Positivo
Temperatura	325 °C
Flujo de gas	10 mL/min
Presión del nebulizador	25 psig
Voltaje del capilar	3500 V
Bajo voltaje	500 V
Voltaje del fragmentador	150 V
Fragmentador de masas	100-930 m/z

Se inyectó un volumen de 25 µL de muestra, realizando la separación en una columna Kinetex 100 C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, Phenomenex). Una vez identificados todos los analitos en orina, las muestras se analizaron en el mismo equipo que se empleó para el análisis de plasma, siguiendo las mismas condiciones cromatográficas. Los resultados obtenidos se normalizaron según el volumen de orina excretado y se expresaron como unidades de concentración µM. Para evitar problemas derivados del efecto matriz, dos columnas de idéntica composición se emplearon separadamente para analizar plasma y orina.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de las distintas metilxantinas y ácidos metilúricos se determinaron por HPLC y calcularon a partir de las siguientes fórmulas:

$$LD = (3,3 \times A)/B$$

$$LQ = (10 \times A)/B$$

siendo A la desviación estándar de la respuesta y B la pendiente de la recta de calibrado. La Tabla 21 muestra los resultados para cada analito.

Tabla 21. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de las metilxantinas y ácidos metilúricos (μM).

Metabolito	LD	LQ
1-metilxantina	0,055	0,167
3- metilxantina	0,041	0,124
7- metilxantina	0,047	0,143
Paraxantina	0,010	0,031
Teobromina	0,022	0,068
Teofilina	0,016	0,047
Cafeína	0,015	0,045
1-metilúrico	0,007	0,020
1,3-metilúrico	0,014	0,042
1,7-metilúrico	0,012	0,036
3,7-metilúrico	0,044	0,135

4.9. Determinaciones bioquímicas y hematológicas en sangre

Las muestras de sangre recogidas al final de cada etapa de los estudios de consumo crónico, Cacao-Salud y Café-Infu-Salud, eran inmediatamente centrifugadas para separar plasma y suero del resto de factores sanguíneos. Una alícuota fue reservada e inmediatamente trasladada a un laboratorio clínico (Escuela de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia, UCM, o Laboratorios de Diagnóstico Unilabs) para las determinaciones bioquímicas y hematológicas.

El perfil lipídico se determinó en muestras de suero siguiendo los métodos de referencia recomendados por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) en un analizador Roche Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics). Los parámetros analizados fueron: colesterol total (CT), lipoproteínas de alta (HDL-C), baja (LDL-C) y muy baja densidad (VLDL-C), junto con triglicéridos (TG) y fosfolípidos.

En suero también se determinaron los valores de ácido úrico, creatinina y glucosa mediante técnicas espectrofotométricas estandarizadas, la concentración de proteína C reactiva (CRP) por un método turbidimétrico ultrasensible automatizado (AU2700

Biochemistry Analyser; Olympus) y las enzimas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) por espectrofotometría.

4.10. Determinaciones de capacidad antioxidante y daño oxidativo a macromoléculas en suero

El efecto del consumo regular de los productos de cacao o café tostado/verde en el estado redox de los voluntarios de los estudios Cacao-Salud y Café-Infu-Salud se determinó por diferentes técnicas que miden la capacidad antioxidante del suero (ORAC, FRAP y ABTS), así como los niveles de los biomarcadores de oxidación lipídica (MDA) y proteica (GC).

4.10.1. Determinación de la capacidad antioxidante.

La capacidad de captación de radicales de oxígeno (ORAC) y del radical catiónico ABTS⁺, y el poder reductor (FRAP) se evaluaron en suero siguiendo los procedimientos previamente descritos (Apartado 2.4). Para el ensayo ORAC las muestras tuvieron que ser diluidas en PBS a una concentración 1/500, mientras que para los ensayos FRAP y ABTS no fue necesario. Las muestras se analizaron por triplicado en los ensayos FRAP y ABTS, y por cuadruplicado en el ensayo ORAC. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol TE/mL}$ de suero.

4.10.2. Oxidación lipídica. Determinación de malondialdehído.

El daño a lípidos séricos se cuantificó mediante la determinación del biomarcador MDA, producto de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados.

Debido a que no hay un patrón de MDA comercialmente disponible, éste se generó por hidrólisis ácida de 1 mL de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en ácido sulfúrico al 1%, manteniéndose durante 2 h a temperatura ambiente y ausencia de luz. La disolución resultante, de concentración 20 nmol/mL, se usó para preparar una recta de calibrado de concentraciones comprendidas entre 0,31-10 nmol/mL. Los distintos puntos de la recta de calibrado, así como las muestras de suero, que no requerían dilución, se sometieron al siguiente tratamiento para la determinación del MDA: 200 μL de muestra o patrón eran sometidos a hidrólisis alcalina (40 μL NaOH 6N, 60°C, 30 min) para liberar el MDA de las proteínas, que posteriormente fueron precipitadas con 100 μL de ácido perclórico al 35%. Tras centrifugación, el sobrenadante se derivatizó a temperatura

ambiente con 20 μ L de dinitrofenilhidrazina (DNPH) 5 mM durante 20 min y en ausencia de luz para determinar el MDA como su derivado hidrazona.

El análisis se llevó a cabo en un HPLC serie 1100 (Agilent Technologies) acoplado a un detector DAD, empleando una columna Nucleosil 120 RP-18 (125 x 4,0 mm, 5 μ m) acoplada a una pre-columna Lichrospher (4 x 4 mm) del mismo material. Como fase móvil se empleó acetonitrilo:ácido acético al 0,2% (38:62, v/v) se usó en modo isocrático a 0,6 mL/min. El equipo era termostatzado a 25°C y los cromatogramas registrados a 310 nm. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron en nmol de MDA/mL de suero (Mateos y cols., 2005).

4.10.3. Daño a proteínas. Determinación de grupos carbonilo.

El daño oxidativo a proteínas séricas se evaluó a través de la determinación del contenido de GC siguiendo la metodología propuesta por Ritcher y colaboradores (2002). Tras precipitar las proteínas con ácido tricloroacético al 20%, el precipitado se lavó 3 veces con 1 mL de mezcla acetato de etilo:etanol (1:1, v/v). El residuo se resuspendió en 500 μ L de guanidina 6 M (pH 2,5) y se midió la absorbancia durante 90 min en un lector de placas BioTek a 360 nm.

El contenido en proteínas de las muestras de suero se determinó por el método Bradford. Para la reacción, el reactivo Bradford era previamente diluido a concentración 1/5 en agua. Seguidamente, 1 mL de reactivo Bradford era adicionado a 5 μ L de muestra y la mezcla era inmediatamente agitada para su análisis espectrofotométrico a 595 nm. Las muestras se analizaron por duplicado. Se empleó una recta de calibrado de γ -globulina con concentraciones comprendidas entre 5 y 40 μ g/mL para cuantificar el contenido en proteínas como μ g/ μ L de suero. El contenido en carbonilos se expresó como nmol de GC/mg de proteína.

4.11. Determinación de marcadores de inflamación, moléculas de adhesión y hormonas.

4.11.1. Estudio crónico CACAO-SALUD

Las muestras de plasma procedentes del estudio Cacao-Salud se analizaron por la técnica de inmunofluorescencia Multiplex Luminex empleando los kits Milliplex Map (Millipore Corp., Billerica, MA, EEUU). Para los análisis, se empleó un equipo Luminex-

100/200 (Luminex Corporation, Austin, TX, EEUU), basado en la técnica de citometría de flujo, siguiendo el protocolo de la casa comercial y empleando controles de calidad de baja y alta concentración con todos los analitos. El software xPONENT se usó para la adquisición y análisis de datos.

Los marcadores analizados fueron los siguientes: interleuquinas IL-1 β , IL-6 y IL-10 , TNF- α , MCP-1 y moléculas de adhesión sICAM-1 y sVCAM-1. Las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se expresaron como ng/mL o pg/mL, según el analito.

4.11.2. Estudio crónico CAFÉ-INFU-SALUD

Las muestras de plasma procedentes del estudio Café-Infu-Salud fueron igualmente analizadas por la técnica Multiplex, empleando kits Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Para este análisis se empleó un lector de fluorescencia Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex operando con el software Bio-Plex Manager™ MP. Conjuntamente se empleó la estación de lavado Bio-Plex Pro Wash Station. Las muestras se analizaron siguiendo los protocolos del fabricante.

Los analitos analizados fueron los siguientes: interleuquinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13 y IL-17, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), interferón gamma (IFN- γ), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y moléculas solubles de adhesión intercelular (sICAM-1) y vascular (sVCAM-1). Adicionalmente, en este estudio se valoró el efecto sobre la hormona grelina y las adipoquinas leptina, inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), resistina y visfatina, así como la influencia sobre la insulina. Las muestras se analizaron por duplicado y los resultados se expresaron como ng/mL o pg/mL, según el analito.

4.12. Determinación de glucosa y cálculo de índices de resistencia a insulina

La determinación cuantitativa de glucosa en las muestras de suero se llevó a cabo mediante el kit colorimétrico de la casa Spinreact (Spinreact, S.A. Saint Esteve de Bas, España). Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg/dL.

A partir de los valores de glucosa y de insulina en ayunas se procedió al cálculo de los índices HOMA (Homeostasis Model Assessment) para estimar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) y función de células beta-pancreáticas (HOMA- β) aplicando las ecuaciones de Matthews y colaboradores (1985):

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Glucosa (mg/dL)} \times \text{Insulina (mU/L)}] / 405$$

$$\text{HOMA-}\beta = [(\text{Insulina (mU/L)} \times 360) / (\text{Glucosa (mg/dL)} - 63)]$$

Adicionalmente, se calculó en índice QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) de acuerdo con la fórmula establecida por Katz y colaboradores (2000):

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log \text{Insulina (mU/L)} + \log \text{Glucosa (mg/dL)}]$$

4.13. Análisis estadístico

Los resultados de los estudios se analizaron estadísticamente usando el programa SPSS versión 19.0 (IBM Company). En el caso de los datos antropométricos, también se analizaron con Statgraphics Centurion XVII (Stat Point Technologies, Inc.).

Primeramente, la normalidad de distribución y homogeneidad de varianza de los datos fue comprobada mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Confirmada su distribución normal y la homogeneidad de la varianza, para el análisis de los resultados obtenidos en los estudios crónicos se aplicó un modelo lineal generalizado de medidas repetidas para conocer el efecto producido por el consumo de cacao o café frente al consumo de su bebida control correspondiente y la situación basal de cada voluntario, así como el efecto debido al grupo, es decir, debido a ser normo o hipercolesterolémico. Adicionalmente, dentro de cada grupo se realizó el test de pares de Bonferroni, que permite comparar por pares la situación basal, el efecto de tomar un producto (cacao o café) y el efecto de tomar la bebida control.

En los estudios de biodisponibilidad se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos para cada uno de los metabolitos observados mediante el programa PK de Microsoft Excel: la concentración máxima (C_{max}), el tiempo para alcanzar dicha concentración (T_{max}) y el área bajo la curva (AUC). En el estudio Cacao-Bio, los

resultados farmacodinéticos obtenidos con cada uno de los productos de cacao se analizaron estadísticamente aplicando un modelo mixto para comparar los resultados de absorción y biodisponibilidad; sin embargo, en el estudio Café-Infu-Bio, al tratarse de un único tratamiento, se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía para comparar la respuesta de absorción con respecto a la situación basal para cada metabolito.

4.14. Tablas de ingesta

A continuación se muestran las tablas de ingesta de fibra dietética, polifenoles y metilxantinas en cada uno de los estudios de intervención llevados a cabo durante esta Tesis Doctoral.

Tabla 22. Dosis (g totales) de los productos de cacao y de café mezcla verde/tostado consumidos en los estudios de biodisponibilidad e ingesta de metilxantinas (mg totales).

	Cacao CC	Cacao CC-MX	Café verde/tostado
Dosis (g)	15	25	3,5
Metilxantinas totales (mg)	94,4	256,0	70,8
Cafeína	9,9	75,8	70,7
Teobromina	84,5	177,0	0,1
Teofilina	-	3,3	-

CC: cacao con un contenido natural de metilxantinas ; CC-MX: cacao enriquecido en metilxantinas.

Tabla 23. Dosis (g/d) de los productos de cacao y de café mezcla verde/tostado consumidos en los estudios crónicos y aporte diario de fibra dietética (g/d), polifenoles, metilxantinas y diterpenos (mg/día).

	Cacao CC-FD	Cacao CC-PP	Café verde/tostado
Dosis (g/d)	30	15	10,5
Fibra dietética total (g/d)	10,2	3,8	4,1*
Fibra soluble	0,5	0,5	4,1*
Fibra insoluble	9,7	3,3	-
Polifenoles totales (mg/d)	472,5	510,6	1261,1
Flavanoles totales (mg/d)	43,8	45,3	
Epicatequina	9,3	18,9	
Catequina	18,0	7,1	
Procianidina B1	0	3,0	
Procianidina B2	16,5	16,4	
Hidroxicinámicos totales (mg/d)			496,0
Ácido 3-cafeoilquínico			89,6
Ácido 4-cafeoilquínico			110,7
Ácido 5-cafeoilquínico			151,1
Ácido 3-feruloilquínico			18,9
Ácido 4-feruloilquínico			58,4
Ácido 5-feruloilquínico			18,3
Ácido 3,4-dicafeoilquínico			21,1
Ácido 3,5-dicafeoilquínico			11,1
Ácido 4,5-dicafeoilquínico			17,0
Metilxantinas totales (mg/d)	168,6	109,8	212,4
Teobromina	153,3	96,5	0,3
Teofilina	-	0,15	-
Cafeína	15,3	13,2	212,1
Diterpenos (mg/d) [†]			
Kahweol			0,01 – 0,06
Cafestol			0,04 – 0,2

CC-FD: cacao enriquecido en fibra dietética; CC-PP: cacao enriquecido en polifenoles. *Dato calculado a partir de Silvan y cols., 2010. [†]Dato de Silva y cols., 2012 para café arábica tostado, preparación 2g de café en 150 mL.

RESULTADOS

BIODISPONIBILIDAD DE METILXANTINAS

Resumen

El objetivo general de la investigación recogida en este capítulo fue la evaluación de la biodisponibilidad de las metilxantinas presentes de forma natural en un producto soluble de cacao (conteniendo principalmente TB) y en el café soluble mezcla tostado/verde (siendo CF la metilxantina mayoritaria en este producto), así como en un producto soluble de cacao enriquecido en metilxantinas, con un elevado contenido en TB, con dosis de CF similares a las proporcionadas por el café soluble estudiado y con una pequeña concentración de TP. El estudio de la biodisponibilidad de las metilxantinas es un aspecto escasamente estudiado en contraposición al extenso conocimiento de la biodisponibilidad de la fracción fenólica de estos alimentos.

Los objetivos fijados para estos estudios fueron los siguientes:

Objetivo 1. Determinar la biodisponibilidad y metabolismo de metilxantinas en voluntarios sanos.

Objetivo 1.1. Estudio farmacocinético de absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas presentes en dos productos solubles de cacao: cacao normal y cacao enriquecido en metilxantinas.

Objetivo 1.2. Estudio farmacocinético de absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas tras el consumo de un producto soluble de café.

Objetivo 1.1. Estudio farmacocinético de absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas presentes en dos productos solubles de cacao.

Metodología

Se llevó a cabo un estudio agudo de intervención en voluntarios sanos para determinar la farmacocinética de absorción, metabolización y eliminación urinaria de metilxantinas del cacao. Estudio de intervención cruzado, aleatorizado, controlado, ciego, realizado en 13 voluntarios que, tras 48 h de abstención de alimentos ricos en polifenoles y metilxantinas, tomaron en días distintos, separados al menos por 10 días, los productos solubles de cacao disueltos en leche semidesnatada. Estudio dosis-respuesta con dos productos solubles de cacao:

a) Cacao control (CC), conteniendo las metilxantinas TB (5,63 mg/g) y CF (0,66 mg/g) presentes de forma natural en el cacao; dosis de cacao ingerida: 15 g.

b) Cacao rico en metilxantinas (CC-MX), producto que, además de las metilxantinas presentes de forma natural, fue enriquecido en estos compuestos bioactivos, conteniendo TB (7,08 mg/g), CF (3,03 mg/g) y TP (0,13 mg/g); dosis de cacao ingerida 25 g.

Se tomaron muestras de sangre y orina a distintos tiempos y se identificaron y cuantificaron por HPLC-DAD y LC-ESI-QTOF distintos metabolitos en muestras biológicas.

Resultados

El método cromatográfico desarrollado permitió la separación con una buena resolución de 12 metilxantinas (MX) y ácidos metilúricos (MU). Los análisis de plasma confirmaron la absorción de TB, CF y TP junto a otras 3 metilxantinas (paraxantina (PX), 3-MX y 7-MX) desde los 30 minutos siguientes al consumo de ambos productos de cacao y a lo largo de las 8 h de intervención. Estos mismos compuestos fueron eliminados en la orina junto a 1-MX y otros derivados metilúricos (1-MU, 1,3-MU, 1,7-MU, 3,7-MU y 1,3,7-MU) a lo largo de 24 h.

De acuerdo a la composición en metilxantinas de los productos estudiados, se observó una absorción y excreción de los metabolitos identificados significativamente mayor tras el consumo del cacao CC-MX, siendo en ambos casos la TB el compuesto mayormente absorbido en plasma y 7-MX el principal metabolito excretado en orina.

Objetivo 1.2. Estudio farmacocinético de absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas tras el consumo de un producto soluble de café mezcla tostado/verde.

Metodología

Se llevó a cabo un estudio agudo de intervención en 12 sujetos sanos para determinar la biodisponibilidad de las metilxantinas del producto soluble de café. Tras 3 días de abstención de alimentos ricos en polifenoles y metilxantinas, los voluntarios tomaron el producto de café, conteniendo 70,69 mg de CF y 0,12 mg de TB. Se tomaron muestras de sangre y orina a distintos tiempos y se identificaron y cuantificaron por HPLC-DAD y LC-ESI-QTOF distintos metabolitos en muestras biológicas.

Resultados

De acuerdo a la composición del café, la principal metilxantina encontrada en el plasma de los voluntarios fue CF, detectada en plasma desde los 30 minutos posteriores a la ingesta, junto a PX como su metabolito mayoritario. Otras metilxantinas (TB, TP, 1-

MX y 7-MX) y ácidos metilúricos (1-MU y 1,7-MU) fueron también encontrados en el plasma durante las 12 h siguientes al consumo del producto de café. Un total de 11 metilxantinas y ácidos metilúricos fueron detectados y cuantificados en la orina de los voluntarios a lo largo de las 24 h de intervención. La CF es principalmente metabolizada a través de la ruta de la PX, tal y como se demuestra por las máximas concentraciones de PX en plasma y de su derivado ácido 1-MU en orina. Se demostró la casi completa metabolización de CF, con tan sólo un 2,7% de la CF ingerida excretada en orina con respecto al total de metabolitos excretados, siendo su derivado 1-MU el compuesto mayoritario con un 67,7 % del total.

Conclusiones

Las metilxantinas presentes de forma natural en café y cacao o adicionadas en un producto soluble de cacao son altamente biodisponibles, siendo extensivamente metabolizadas previamente a su rápida eliminación urinaria, mostrando además una relación dosis-dependiente cuando se trata de ingestas moderadas.

Objetivo 1.1. Estudio farmacocinético de absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas presentes en dos productos solubles de cacao.

Artículo 1.

Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents.

Sara Martínez-López, Beatriz Sarriá, Miren Gómez-Juaristi, Luis Goya, Raquel Mateos, Laura Bravo-Clemente

Food Research International (2014), en prensa (doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.009)



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents

Sara Martínez-López, Beatriz Sarriá, Miren Gómez-Juaristi, Luis Goya, Raquel Mateos, Laura Bravo-Clemente *

Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2013

Received in revised form 18 February 2014

Accepted 4 March 2014

Available online xxx

Keywords:

Cocoa

Methylxanthines

Human

Bioavailability

Liquid-chromatography

ABSTRACT

The health promoting properties of cocoa products and their excellent acceptance by consumers turn cocoa into an important product for enrichment with bioactive components, such as methylxanthines (MX), adding potential health properties to cocoa products. The present work aimed at studying the bioavailability of methylxanthines in two soluble cocoa products, one containing methylxanthines naturally occurring in cocoa (CC) and a product enriched in methylxanthines (CC-MX). A crossover, randomized, controlled, single-blind study was carried out in 13 healthy subjects who consumed realistic doses of the two cocoa products in milk. CC provided 84.45 mg of theobromine (TB) and 9.9 mg of caffeine (CF), while CC-MX provided 177 mg TB, 75.75 mg CF and 3.25 mg theophylline (TP). In each intervention, blood samples were collected at baseline ($t = 0$) and 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h after drinking the beverages. Urine was collected at different time intervals (baseline ($-2-0$ h), 0–4, 4–8, 8–12 and 12–24 h).

TB, CF, TP and paraxanthine (PX) together with two monomethylxanthines (3-MX and 7-MX) were identified and quantified in plasma by HPLC-DAD. These metabolites together with 1-MX and different mono-, di- and tri-methyluric (MU) acids (1-MU, 1,3-MU, 1,7-MU, 3,7-MU and 1,3,7-MU) involved in the biotransformation of the ingested methylxanthines were detected by LC-QTOF and quantified by LC-DAD, with 7-MX and TB as the major urinary metabolites. The maximum concentration (C_{max}) and area under curve (AUC) values of all metabolites were significantly higher after the intake of CC-MX, showing a dose-dependent response. In conclusion, cocoa methylxanthines show high bioavailability and rapid excretion, with a direct relationship existing between the amount of methylxanthine consumed and the metabolites quantified in biological fluids.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Methylxanthines are purine alkaloids commonly present in the diet. The number and positions of methyl substitutes in the xanthine ring determine the differences between the major dietary methylxanthines, the trimethylxanthine caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) and the dimethylxanthines theobromine (3,7-dimethylxanthine) and theophylline (1,3-dimethylxanthine). Caffeine, theobromine and theophylline naturally occur in a wide variety of foods and beverages, such as coffee, cocoa, tea, yerba mate, as well as in energizing drinks, and thus they are widely consumed worldwide, contrary to paraxanthine (1,7-dimethylxanthine), which is the main metabolite of caffeine biotransformation and thus high concentrations are found in plasma and urine after caffeine intake, although it is not found in foods.

Methylxanthines have important pharmacological properties and thus they are commonly used as therapeutic agents. Stimulatory effects on the central nervous system as well as on the gastrointestinal, cardiovascular, renal and respiratory systems have been ascribed to these compounds (De Sena, Aparecida de Assis, & Branco, 2011). Caffeine (CF) could be considered the most widely consumed neuroactive drug worldwide. CF consumption has shown beneficial effects on the endocrine, neuronal, renal and respiratory systems (Daly, 2007). Neuroprotective effects against Alzheimer and Parkinson diseases, as well as increase in alertness and sense of well-being or even possible anticancer activity have been described for CF, although high consumption has also been associated to negative effects, such as agitation, hypertension or insomnia (Porkka-Heiskanen, Zitting, & Wigren, 2013). Its main metabolite, paraxanthine (PX), although initially thought to be pharmacologically inactive, is now known to be a central nervous system stimulant, with locomotor activating effects (Okuro et al., 2010). Theobromine (TB) is the second most important methylxanthine in the diet, with similar effects to those of CF, improving alertness without inducing irregular heartbeat or hypertension (Mitchell et al., 2011), also having diuretic and bronchial muscle relaxing effects (De Sena et al., 2011). TB has also

* Corresponding author at: Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Spanish National Research Council (CSIC), C/José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 915492300.
E-mail address: lbravo@ictan.csic.es (L. Bravo-Clemente).

been considered antitussive (Usmani et al., 2005). Theophylline (TP) has similar pharmacological and toxicological properties as CF. It is considered the most diuretic methylxanthine and it has strong bronchodilator effects (Schmidt et al., 2006), although its chronic or excessive intake may cause toxic effects, inducing tachycardia, convulsions and gastrointestinal difficulties (Stavric, 1988).

Cocoa and cocoa products, including chocolate and cocoa drinks, are consumed worldwide by different population groups, being Europe the world's largest cocoa consuming area with a 40% of global consumption (Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2003). Cocoa products are the main dietary source of TB. Cocoa beans contain between 1 and 4% of TB (De Sena et al., 2011), compared to cocoa powder with 1–3% of TB and less than 0.3% of CF (Apgar & Tarka, 1999). The health benefits of consuming cocoa products are numerous, having shown positive effects on blood pressure, endothelial function, antioxidant status, platelet activity or insulin resistance (Cooper, Donovan, Waterhouse, & Williamson, 2008; Taubert, Roesen, Lehmann, Jung, & Schöming, 2007) and improvements of mood and cognitive function (Smit, Gaffan, & Rogers, 2004). These effects have been attributed to the polyphenolic component, but it seems that methylxanthines may also play a role (Corti, Flammer, Hollenberg, & Lüscher, 2009; Jalil, Ismail, Pei Pei, Hamid, & Kamaruddin, 2008; Rodríguez-Ramiro, Martín, Ramos, Bravo, & Goya, 2010), although the contribution of dietary fiber to the health effects of cocoa products has also been shown (Sarría et al., 2012).

The health promoting properties of cocoa products and their excellent acceptance by consumers turn cocoa into an important product for enrichment with bioactive components, such as dietary fiber, polyphenols or methylxanthines. One of the major objectives of the cocoa manufacturing industry is to elaborate products with improved functional properties that maintain their organoleptic attributes.

There is abundant information on the bioavailability of cocoa polyphenols. As for methylxanthines, it is known that they are extensively absorbed in the gastrointestinal tract and metabolized in the liver to yield methylxanthine derivatives and methyluric acids as the major metabolites, which are finally excreted in urine (Arnaud, 2011; Rodopoulos, Wisen, & Norman, 1995). The cytochrome P450 is involved in methylxanthine metabolism, together with the enzyme xanthine oxidase. Knowledge on methylxanthine bioavailability comes mostly from pharmacokinetic studies on their metabolism and disposition after the intake of high, pharmacological doses of pure methylxanthines (Rodopoulos, Hojvall, & Norman, 1996; Rodopoulos & Norman, 1996, 1997; Rodopoulos et al., 1995). However, there is little information on their bioavailability when taken in the food as part of a meal.

The objective of the present work was to assess in healthy subjects the bioavailability of methylxanthines present in soluble cocoa products. Two different commercial cocoa products were used, one containing the methylxanthines naturally occurring in soluble cocoa powder and another product enriched in methylxanthines.

Materials and methods

Chemical reagents

Two cocoa powder products were supplied by Nutrexpa, S.L. (Barcelona, Spain): a soluble cocoa product with no added methylxanthines (control cocoa, CC) and a soluble cocoa product enriched with methylxanthines (CC-MX). Perchloric acid, formic acid, methanol and acetonitrile (HPLC grade) were obtained from Panreac. Caffeine, paraxanthine, theobromine, theophylline, 1-methylxanthine (1-MX), 3-methylxanthine (3-MX), 7-methylxanthine (7-MX), and the acids 1-methyluric (1-MU), 1,3-dimethyluric (1,3-MU), 1,7-dimethyluric (1,7-MU) and 3,7-dimethyluric (3,7-MU) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Stock solutions were prepared in Milli-Q water and stored at -20°C . 1-methyluric acid was dissolved in 10% methanol.

Subjects and study design

The study protocol was conducted in accordance with the ethical recommendations of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta del Hierro in Majadahonda (Madrid, Spain). Volunteer recruitment was carried out through placing advertisements and short talks before lectures in the Complutense University. A randomized, controlled, crossover, single-blind study was carried out in healthy men and women, aged 18–45 years old, with body mass index between 18 and 25 kg/m^2 . They were non-smoker, non-vegetarian, non-pregnant women, who were not taking any medication or nutritional supplements, not suffering from any chronic pathology or gastrointestinal disorder. The sample size was estimated attending to previous bioavailability studies (Lang et al., 2013; Llorach, Urpi-Sarda, Jauregui, Monagas, & Andres-Lacueva, 2009; Ptolemy, Tzioumis, Thomke, Rifai, & Kellogg, 2010). Fourteen volunteers gave their informed consent prior to participation, but only thirteen completed the study (Table 1).

The study was carried out at the Human Nutrition Unit of ICTAN in different interventions separated by periods of ten days. After an overnight fast, volunteers consumed the cocoa products dissolved in 200 mL of semi-skimmed milk in each cocoa intervention. Following the cocoa manufacturer indications to reproduce habitual intakes of cocoa powder, doses of 15 g of CC and 25 g of CC-MX were provided. 2 and 4 h after consuming the test beverage, polyphenol and methylxanthine-free breakfast and lunch were provided. Water and isotonic beverages free of methylxanthines were available ad libitum. The two days previous to each intervention subjects maintained diets free of certain polyphenol- and methylxanthine-rich foods such as some fruits, vegetables and their derivative beverages, coffee, tea, cola drinks or chocolate products. Volunteers were asked to complete a 24 h food intake recall the day before each intervention in order to control any possible food restriction incompliance.

On each intervention day, a nurse inserted a cannula in the cubital vein of the non-prevailing arm of the volunteers and blood samples were collected into EDTA-coated tubes at baseline ($t = 0$) and 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h after consuming the cocoa drinks. Plasma was separated by centrifugation (10 min, 1500 g, 4°C) and stored at -80°C for further analysis. Urine samples were collected in 24 h urine collection containers on each intervention day at different time intervals ($t = -2-0, 0-4, 4-8, 8-12$ and $12-24$ h) and were frozen at -20°C .

Cocoa composition

The methylxanthine composition of cocoa products was determined in our laboratory. One gram of the cocoa product was extracted following the procedure by Bravo and Saura-Calixto (1998). Extracts were dried under reduced pressure and dissolved in 200 μL of 1% formic acid (solvent A), filtered (0.45 μm) and 50 μL injected into the HPLC system. An Agilent 1200 series liquid chromatographic system coupled to a thermostatic autosampler, column oven and diode-array detector (DAD) was used. The separation was carried out in a Superspher 100 RP-18 column (250 mm, 4 μm , Merck) protected with an ODS RP18 guard column. A binary gradient of 1% formic acid in deionized water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) was used at a flow rate of 0.6 mL/min (Martin et al., 2008). The column compartment was set up at 30°C and chromatograms were registered at 272 nm. TB, CF, and TP were identified and quantified by comparing with standards.

Table 1
Baseline characteristics of the subjects participating in the study.

	Age (years)	Weight (kg)	Height (m)	BMI (kg/m^2)
Men ($n = 3$)	26.67 \pm 3.21	75.60 \pm 11.26	1.83 \pm 0.02	22.47 \pm 2.97
Women ($n = 10$)	32.60 \pm 9.85	61.36 \pm 9.61	1.62 \pm 0.04	23.36 \pm 3.73

Values represent the mean \pm SD. BMI: body mass index.

Please cite this article as: Martínez-López, S., et al., Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different..., *Food Research International* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.009>

CC contained 6.29 mg/g dry matter of total methylxanthines (5.63 ± 0.06 mg/g TB and 0.66 ± 0.06 mg/g CF) and CC-MX contained 10.24 mg/g dry matter (7.08 ± 0.22 mg/g TB, 3.03 ± 0.28 mg/g CF, and 0.13 ± 0.02 mg/g TP). CC and CC-MX doses administered to the volunteers provided 94.35 and 256 mg of total methylxanthines, respectively.

Sample preparation: methylxanthine extraction from biological samples

Methylxanthines were extracted from plasma as described by Schreiber-Deturmeny and Bruguerolle (1996) with some modifications. To separate plasma proteins, 100 μ L of plasma was acidified with 40 μ L of 20% perchloric acid. Samples were vortexed and centrifuged (10 min, 10,500 rpm, 4 °C). The supernatant was collected and 25 μ L was injected into the HPLC. Urine samples were centrifuged (10 min, 12,500 rpm, 4 °C), supernatants were filtered using 0.45 μ m pore-size cellulose-acetate membrane filters (Albet) and a 25 μ L aliquot was directly injected into the HPLC equipment.

Metabolite identification

Methylxanthines (tri-, di-, and mono-methylxanthines) and methyluric acids were simultaneously separated in an Agilent 1200 series liquid chromatographic system coupled to a thermostatic autosampler and a diode-array detector (DAD). Identical chromatographic conditions were employed to analyze plasma and urine samples, injected in a Kinetex 100 C18 (4.6×250 mm, 5 μ m, Phenomenex) column with holder AJO-9000 and pre-column AJO5768 C18 maintaining the oven temperature at 25 °C. To avoid interferences due to the matrix, two identical columns were used to separately analyze plasma and urine samples. A gradient elution was carried out with a ternary system, using 1% formic acid in micro-filtered water (solvent A), methanol (solvent B) and acetonitrile (solvent C) at a constant flow rate of 0.7 mL/min. The mobile phase was initially programmed with 99% of solvent A and 1% of B. The elution program increased to 4.5, 9, 13.5, 31.5 and 90% of solvent B and 0.5, 1, 1.5, 3.5 and 10% of solvent C at 2, 30, 33, 38 and 40 min, respectively, recovering and maintaining the initial conditions during 10 min at the end of the program. This chromatographic method allowed separating twelve compounds without interferences. Chromatograms were registered at 272 and 289 nm in a diode-array-detector (DAD). The identification was carried out comparing retention times and UV spectra with pure standards. In addition, metabolites in urine samples were identified by mass spectrometry using the same chromatographic conditions in a 1200 Agilent LC-DAD system coupled to an accurate Q-TOF mass spectrometer (Agilent Technologies). The ESI source of the mass-spectrometer was operated in positive ion mode programming temperature and flow gas at 325 °C and 10 mL/min, respectively. A 25 μ L aliquot was injected and analyzed in a Kinetex 100 C18 (4.6×250 mm, 5 μ m, Phenomenex) column.

For quantification, calibration curves were prepared diluting standards in micro-filtered water, except for 1-methyluric acid that required 10% methanol. Due to the lack of 1,3,7-trimethyluric (1,3,7-MU) acid standard, this metabolite was quantified as equivalents of its precursor, CF. Urine results were normalized by the volume excreted in each time point studied.

Pharmacokinetic and statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the program SPSS 19.0. To compare the absorption and elimination of each metabolite after the two cocoa interventions, methylxanthine kinetics in the biological samples were studied using the pharmacokinetic functions of Microsoft Excel (Rubio et al., 2012). Maximum concentration (C_{max}), area under curve (AUC) and time to reach maximum concentration (T_{max}) were calculated and statistically analyzed applying a mix model. The significance level was set at $p < 0.05$. Data are given as mean \pm standard deviation.

Results

HPLC-DAD and LC-QTOF identification of methylxanthines and metabolites

A one-step acid hydrolysis pre-treatment of plasma allowed precipitation of proteins and analyses of methylxanthines in an aliquot of clear sample without interferences. Urine samples were untreated and injected directly on the HPLC after centrifugation and filtration. Typical chromatograms of plasma and urine samples after CC-MX consumption are shown in Fig. 1A and B, respectively. Identification was done by comparison with standards; however, due to the lack of 1,3,7-methyluric standard, LC-QTOF was necessary to identify this metabolite in urine allowing also to confirm the rest of metabolites. The main compounds identified by HPLC-DAD and LC-QTOF are depicted in Table 2, where it is indicated the molecular formula, molecular weight (accurate mass), $[M + H]^+$ after ionization during analysis by LC-QTOF, as well as the retention times observed by HPLC-DAD analysis. The good separation and resolution of all the chromatographic peaks were appropriate to identify and quantify the methylxanthines and metabolites present in biological samples.

Methylxanthine determination in plasma

Plasma samples were analyzed at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h after consuming the soluble cocoa product with TB and CF naturally present in cocoa (CC) and the methylxanthine-rich cocoa product (CC-MX), with higher contents of TB and CF, also containing minor amounts of TP.

The compounds detected in plasma by HPLC-DAD after consumption of both products were CF and TB, naturally present in cocoa, together with variable amounts of their metabolites such as PX, TP, 3-MX and 7-MX (Table 2). The curves of absorption of the compounds found in plasma after both cocoa interventions are represented in Fig. 2. All metabolites were found along the 8 h sampling time in the two cocoa interventions. After consumption of CC, plasma concentrations rapidly increased in the following 0.5–1 h maintaining similar levels throughout the 8 h, not returning to basal levels in this period. After CC-MX, the highest concentrations of methylxanthines were observed at 2 or 4 h for most metabolites, except for TP. This methylxanthine is present in low amounts in the CC-MX product; however, it is worth noting that baseline levels of TP and PX after both interventions were high (around 6–8 μ M) in spite of the 48 h restriction of methylxanthine-containing foodstuffs. Plasma concentrations of TB, CF, 3-MX and 7-MX were much higher after consuming the CC-MX in comparison with CC values, showing a dose–response effect, although again not returning to basal levels after 8 h.

Pharmacokinetic parameters (Table 3) show that TB was the predominant methylxanthine in both interventions, followed by TP, PX, CF, 7-MX and 3-MX. Values were significantly higher after CC-MX intervention, except for TP that showed similar values after both cocoas. The time to reach maximum concentrations, T_{max} , ranged between 1.8 and 4.6 h; however, results did not vary significantly with products.

Methylxanthine determination in urine

Analysis of urine samples by HPLC showed the presence of a wide range of compounds. In addition to the methylxanthines found in plasma (TB, CF, PX, TP, 7-MX and 3-MX), 1-MX was also detected, along with mono- (1-MU), di- (1,3-MU, 1,7-MU and 3,7-MU) and trimethyluric (1,3,7-MU) acids (Table 2).

The evolution of urinary metabolites after the two cocoa interventions is shown in Fig. 3. Except for some volunteers that excreted trace amounts of 3-MX, 7-MX and TB in baseline urine (–2–0 h), no methylxanthines could be detected in baseline urine samples. All metabolites showed a similar trend, peaking at intervals 0–4 or 4–8 h, decreasing in the next sampling interval (8–12 h) with a further increase in

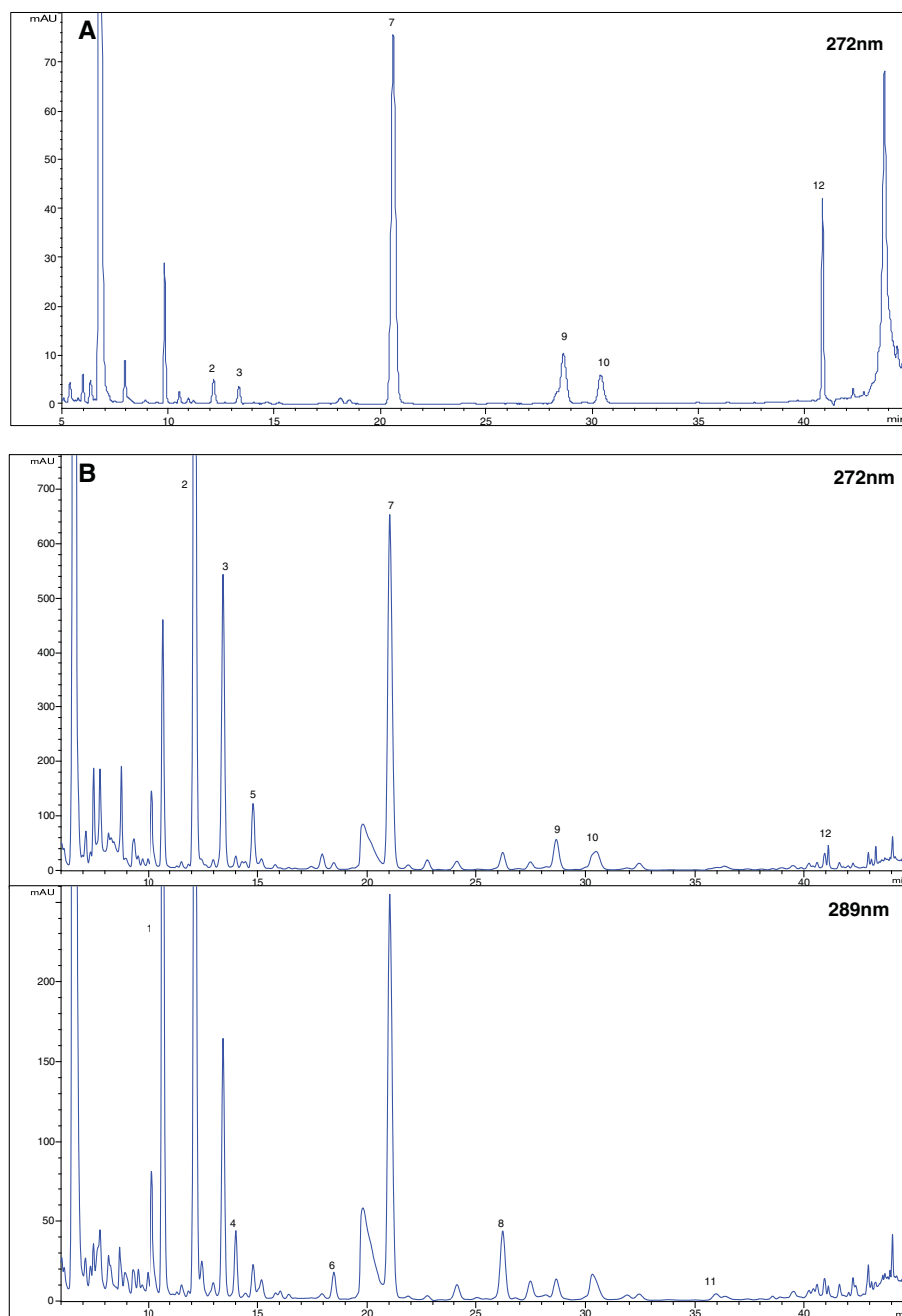


Fig. 1. Chromatograms of plasma (A) and urine (B) obtained from a volunteer after consumption of the methylxanthine-rich cocoa (CC-MX). Methylxanthines and methyluric acids were registered at 272 and 289 nm, respectively. Compounds found were (in order of elution): 1-MU (1), 7-MX (2), 3-MX (3), 3,7-MU (4), 1-MX (5), 1,3-MU (6), TB (7), 1,7-MU (8), PX (9), TP (10), 1,3,7-MU (11) and CF (12).

Table 2
Chromatographic parameters of metabolites detected in plasma and urine after cocoa consumption.^a

Metabolite	Common name	Retention time (min)	Molecular formula	Molecular Weight	(M + H) ⁺
Monomethylxanthine	1-Methylxanthine (5)	13.8	C ₈ H ₆ O ₂ N ₄	166.0491	167.0564
	3-Methylxanthine (3)	12.5	C ₈ H ₆ O ₂ N ₄	166.0491	167.0564
	7-Methylxanthine (2)	11.4	C ₈ H ₆ O ₂ N ₄	166.0491	167.0564
Dimethylxanthine	1,7-Methylxanthine (PX) (9)	26.5	C ₇ H ₈ O ₂ N ₄	180.0647	181.0720
	3,7-Methylxanthine (TB) (7)	19.6	C ₇ H ₈ O ₂ N ₄	180.0647	181.0720
	1,3-Methylxanthine (TP) (10)	27.7	C ₇ H ₈ O ₂ N ₄	180.0647	181.0720
Trimethylxanthine	1,3,7-Methylxanthine (CF) (11)	40.2	C ₈ H ₁₀ O ₂ N ₄	194.0804	195.0877
Monomethyluric acid	1-Methyluric acid (1)	10.3	C ₈ H ₆ O ₃ N ₄	182.0440	183.0513
Dimethyluric acid	1,3-Methyluric acid (6)	17.2	C ₇ H ₈ O ₃ N ₄	196.0596	197.0667
	1,7-Methyluric acid (8)	24.1	C ₇ H ₈ O ₃ N ₄	196.0596	197.0667
	3,7-Methyluric acid (4)	13.0	C ₇ H ₈ O ₃ N ₄	196.0596	197.0667
Trimethyluric acid	1,3,7-Methyluric acid (12)	33.0	C ₈ H ₁₀ O ₃ N ₄	210.0753	211.0826

^a Bold numbers in parenthesis correspond with peaks shown in Fig. 1.

excretion at 24 h. Concentration of urinary metabolites after CC-MX intake was higher than after consumption of CC, observing a dose-response effect. Contrary to what occurred in plasma, TP and PX could not be detected in basal urine samples (–2–0 h). High amounts of TB were excreted after CC-MX intake. Appreciable amounts of non-metabolized CF were also excreted in urine.

Urinary pharmacokinetic parameters of methylxanthines and metabolites after both cocoa interventions are shown in Table 4. The main metabolites excreted were 7-MX, TB and 3-MX. A high excretion of 1-MU was observed, followed by 1-MX, 1,7-MU, PX, 3,7-MU and CF. Minor amounts of 1,3-MU, TP and 1,3,7-MU were also excreted. C_{max} and AUC values were higher when volunteers consumed CC-MX reaching statistical significance. T_{max} ranged between 14.2 and 21.5 h

during the CC intervention; the higher methylxanthine intake in the CC-MX intervention resulted in shorter T_{max} times, ranging between 7.6 and 18 h; however, no significant differences were observed between products, except for 1-MX, 1-MU and 1,3,7-MU.

Absorption and urinary elimination was highly efficient, with a total excretion of methylxanthines and metabolites of 104.5% of the amount ingested during the CC intervention, and 94.9% after CC-MX. CF was extensively metabolized, since only 7.4 and 3.7% of the ingested CF was detected in urine after CC and CC-MX intake, respectively. As for TB, up to 26.9% was excreted in 24 h urine after CC intervention, with a 3-MX + 7-MX/TB ratio of 2.89. After CC-MX intake, TB excretion increased to 41.6% of the amount ingested (3-MX + 7-MX/TB ratio of 1.62), suggestive of a potential saturation of TB metabolism.

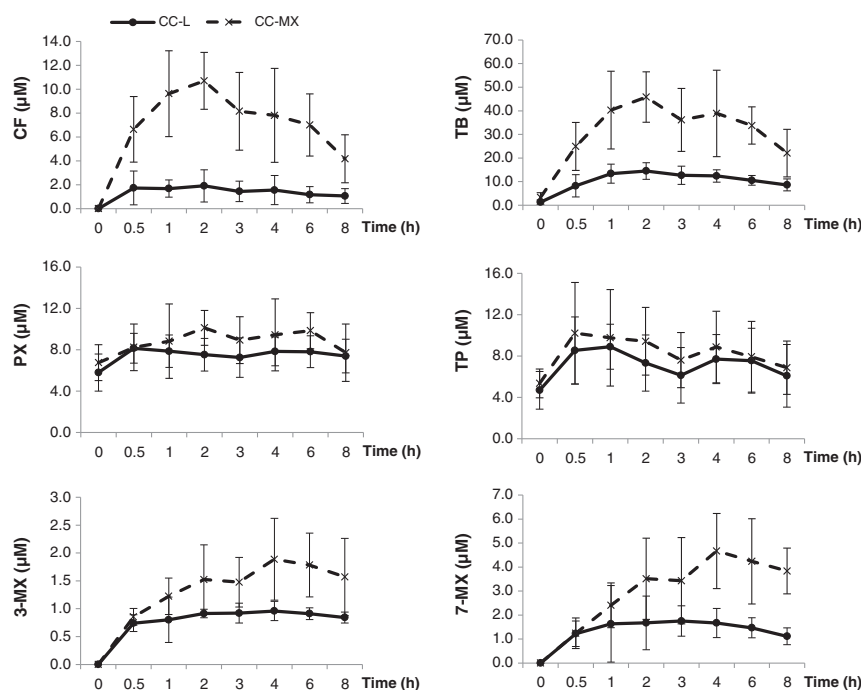


Fig. 2. Comparison of plasma concentrations of methylxanthines and metabolites after consuming the control cocoa (CC, solid line) and the methylxanthine-rich cocoa (CC-MX, dashed line). Results represent the concentration (µM) as mean ± standard deviation.

Please cite this article as: Martínez-López, S., et al., Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different..., *Food Research International* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.009>

Table 3
Pharmacokinetic parameters of methylxanthines and derived metabolites detected in human plasma.^a

Metabolite	CC			CC-MX			p Value		
	C _{max} (μM)	AUC (μM/h)	T _{max} (h)	C _{max} (μM)	AUC (μM/h)	T _{max} (h)	C _{max}	AUC	T _{max}
Caffeine	2.1 ± 1.3	10.8 ± 6.4	2.1 ± 2.0	12.1 ± 2.6	58.2 ± 12.3	2.0 ± 1.1	<0.001	<0.001	N.S.
Paraxanthine	9.5 ± 1.3	62.3 ± 9.1	4.5 ± 2.9	12.0 ± 2.2	69.8 ± 15.4	3.5 ± 2.5	0.002	0.044	N.S.
Theobromine	15.8 ± 3.3	88.8 ± 15.3	1.9 ± 1.0	51.9 ± 13.0	262.2 ± 59.9	2.2 ± 1.1	<0.001	<0.001	N.S.
Theophylline	11.5 ± 2.6	63.5 ± 21.5	3.1 ± 3.2	12.3 ± 4.3	62.8 ± 25.4	1.9 ± 2.3	N.S.	N.S.	N.S.
3-methylxanthine	0.6 ± 1.4	1.8 ± 1.8	3.4 ± 3.3	1.8 ± 0.9	9.9 ± 5.3	2.2 ± 2.5	<0.001	0.001	N.S.
7-methylxanthine	2.1 ± 1.4	11.5 ± 5.1	3.3 ± 1.6	4.6 ± 1.8	26.2 ± 11.5	4.5 ± 1.5	0.001	0.001	N.S.

^a Values represent mean ± standard deviation. P values were calculated using a mix model (SPSS 19.0 program).

Discussion

Methylxanthines present in cocoa, coffee, tea or yerba mate, among others, have recently attracted interest due to their potential health effects. It has been shown that methylxanthines have no effect increasing blood pressure, an important risk factor of cardiovascular disease, as previously thought (Mitchell et al., 2011). Moreover, the ability described for cocoa polyphenols to increase HDL-cholesterol levels could be influenced by the presence of TB, the most abundant methylxanthine in cocoa (Neufingerl, Zebregs, Schuring, & Trautwein, 2013).

The bioactivity of phytochemicals depends on their intestinal absorption and subsequent metabolism; however, there are few studies on the bioavailability of methylxanthines, mostly performed with pharmacological doses of pure methylxanthines and primarily on coffee methylxanthines when dealing with actual foods (Lang et al., 2013). For this reason, in the present work a comparative study on the bioavailability of methylxanthines contained in two different cocoa products was carried out.

Among the analytical techniques used to detect methylxanthines in biological fluids, solid phase extraction (SPE) procedures have been commonly used to isolate methylxanthines in plasma (Emara, 2004; Kuwazawa et al., 1999) and urine (Georga, Samanidou, & Papadopyannis, 2001; Thevis, Opfermann, Krug, & Schanzwer, 2004; Zydron, Baranowski, & Baranowska, 2004) followed by reverse phase HPLC separation coupled to ultraviolet absorbance detection (Georga et al., 2001; Zydron et al., 2004) or mass spectrometry (Schneider, Ma, & Glatt, 2003; Thevis et al., 2004). We tested different procedures for the analysis of plasma methylxanthines, finally selecting the method of Schreiber-Deturmeny and Bruguerolle (1996) based on acid precipitation of plasma proteins, which provided similar results to those obtained after SPE, being simpler and less time-consuming. Similarly, direct analysis of urine samples was performed after centrifugation and filtration with good results in accordance with current trends in reducing or avoiding pre-treatment steps (Ptolemy et al., 2010). Analyses of methylxanthines and their metabolites by LC-QTOF and HPLC-DAD allowed the identification and quantification of up to twelve metabolites in a single run thanks to the good peak resolution obtained with the selected chromatographic conditions (Fig. 1).

Orally administered methylxanthines are rapidly absorbed from the gastrointestinal tract in humans and metabolized almost exclusively in the liver (Rodopoulos & Norman, 1996, 1997; Rodopoulos et al., 1995, 1996). Metabolic pathways of methylxanthines have been reviewed by Arnaud (2011) and are represented in Fig. 4. TB, the major methylxanthine in cocoa, and TP present in CC-MX, are also metabolites resulting from the N1- and N7-demethylation of CF, respectively. However, CF's main metabolite is PX as a product of N3-demethylation, representing up to 80% of CF metabolism in comparison with 12% TB and 7% TP (Atia, York, & Clark, 2009). The conversion of CF into PX is exclusively mediated via CYP1A2, whereas other enzymes are also involved in the biotransformation to TB and TP (CYP2E1). Further oxidative

N-demethylation to produce monomethylxanthines (1-methylxanthine (1-MX), 3-methylxanthine (3-MX) and 7-methylxanthine (7-MX)) is also catalyzed by the same members of the cytochrome P450 family, CYP1A2 and to a lesser extent CYP2E1. The biotransformation of dimethylxanthines to their corresponding dimethyluric acids (1,3-methyluric (1,3-MU), 1,7-methyluric (1,7-MU), 3,7-methyluric (3,7-MU)) occurs by hydroxylation (C8 oxidation) procedures involving also the cytochrome P450 isoforms; however, the transformation of monomethylxanthines to monomethyluric acids (1-methyluric (1-MU), 3-methyluric (3-MU), 7-methyluric (7-MU)) is catalyzed by the enzyme xanthine oxidase. Although to a lesser extent, CF is also metabolized to trimethyluric acid (1,3,7-MU) with the intervention of the CYP3A4 enzyme. Dimethylxanthines have lower renal clearance than monomethylxanthines and methyluric acids, which have high renal excretion rates (Arnaud, 2011; Rodopoulos et al., 1995).

In the present study, plasma concentrations of methylxanthines and their metabolites were significantly higher after consuming CC-MX compared to CC, being TB the most abundant compound as could be expected considering the higher intake of this methylxanthine (177.00 vs 84.45 mg in the CC-MX and CC interventions, respectively) in comparison with CF (75.75 vs. 9.90 mg after CC-MX and CC, respectively) and TP (3.25 mg after CC-MX). Although intake of TB was nearly double after CC-MX in comparison with CC, plasma C_{max} values were nearly 3.3 times higher in the CC-MX intervention compared to CC (Table 3), which might be partly accounted for the contribution of TB resulting from CF metabolism (N1-demethylation). A similar proportion was maintained in TB excretion in 24 h urine (73.63 mg after CC-MX vs. 22.7 mg after CC intake).

In both interventions, besides TB the other dimethylxanthines, PX and to a lower extent TP, were more abundant in plasma than their main precursor, CF. CF is rapidly metabolized with predominant biotransformation into PX, which explains the higher plasma levels of the dimethylxanthines. As mentioned above, dimethylxanthines renal clearance is lower than that of monomethylxanthines and methyluric acids (Arnaud, 2011; Rodopoulos et al., 1995), which might explain the high plasma levels of TB, PX and TP, as well as the presence of PX and TP in fasting plasma after 48 h of methylxanthine-containing food restriction. However, uncompliance with the indicated restrictions cannot be ruled out, although dietary records do not support this possibility; alternatively, an unknown endogenous metabolism might be responsible for the presence of low amounts of these dimethylxanthines in plasma at baseline. This remains an open question that would require further research with longer, closely controlled dietary restrictions. A higher renal clearance of monomethylxanthines would also account for the low plasma levels of 3-MX and 7-MX after the two cocoa interventions, although absorption was significantly higher when volunteers consumed the methylxanthine-rich cocoa product. The differences found between the two interventions for all compounds studied would be attributable to the enrichment of the cocoa powder and confirm a dose-dependent response in plasma metabolite levels. All metabolites appeared in plasma from 30 min after cocoa intake,

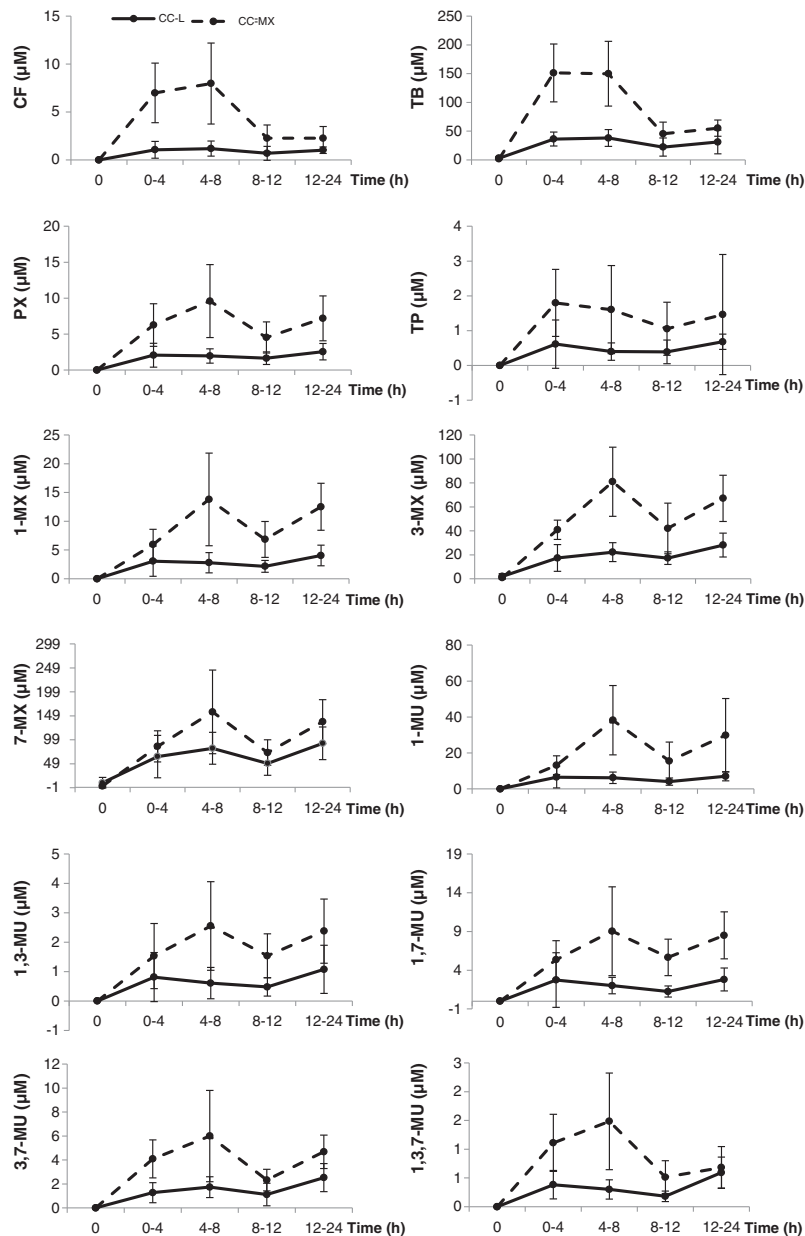


Fig. 3. Comparison of urinary methylxanthines and derived metabolites excreted after consumption of control cocoa (CC, solid line) and methylxanthine-rich cocoa (CC-MX, dashed line). Results represent the concentration (μM) as mean \pm standard deviation.

indicating a rapid absorption and metabolization, with T_{max} values ranging between 1.9 and 4.5 h (Table 3).

Urinary excretion by some volunteers of 3-MX, 7-MX and TB after a fasting overnight could also be originated from an endogenous metabolism; however, Zamboni, Aresta, and Palmisano (2004) found a natural xanthine contamination in basal urine of regular caffeine consumers.

Although noncompliance of food restrictions cannot be ruled out, it is worth mentioning that in some of these volunteers, urinary excretion of 7-MX and 3-MX showed a remarkable increase in the 12–24 h interval (data not shown), pointing to a slower metabolism that might explain the presence of metabolites in basal urine samples. Slower methylxanthine metabolism has been reported in patients with liver

Table 4
Pharmacokinetic parameters of methylxanthines and derived metabolites detected in human urine.^a

Metabolite	CC			CC-MX			p Value		
	C _{max} (μM)	AUC (μM/h)	T _{max} (h)	C _{max} (μM)	AUC (μM/h)	T _{max} (h)	C _{max}	AUC	T _{max}
Caffeine	2.1 ± 0.7	19.5 ± 8.8	14.5 ± 9.3	9.9 ± 3.5	88.3 ± 32.6	7.7 ± 5.5	<0.001	<0.001	N.S.
Paraxanthine	3.5 ± 1.8	41.8 ± 14.3	15.1 ± 9.0	10.7 ± 5.8	131.8 ± 76.5	11.7 ± 7.5	0.001	0.001	N.S.
Theobromine	50.4 ± 18.4	643.7 ± 149.0	14.2 ± 9.6	177.4 ± 45.0	1832.4 ± 595.0	7.7 ± 5.5	<0.001	<0.001	N.S.
Theophylline	1.0 ± 0.4	9.2 ± 2.9	14.9 ± 8.9	2.5 ± 1.3	19.4 ± 5.2	7.6 ± 5.8	0.004	0.005	N.S.
1-Methylxanthine	5.5 ± 2.7	63.9 ± 28.7	21.2 ± 6.8	15.3 ± 7.3	196.6 ± 81.9	13.7 ± 7.7	<0.001	<0.001	0.024
3-Methylxanthine	34.8 ± 8.9	475.4 ± 89.8	14.8 ± 9.1	98.1 ± 21.9	1174.0 ± 521.8	12.0 ± 7.4	<0.001	<0.001	N.S.
7-Methylxanthine	110.1 ± 40.1	1536.3 ± 626.1	16.3 ± 8.7	187.4 ± 82.1	2459.5 ± 894.7	12.0 ± 7.2	0.003	0.013	N.S.
1-Methyluric acid	9.2 ± 4.1	119.6 ± 43.2	19.7 ± 8.2	45.2 ± 16.4	465.5 ± 193.3	12.4 ± 7.5	<0.001	<0.001	0.049
1,3-Methyluric acid	1.3 ± 1.1	16.7 ± 12.6	21.5 ± 6.0	3.4 ± 1.9	52.9 ± 25.5	18.0 ± 7.5	0.007	0.004	N.S.
1,7-Methyluric acid	3.9 ± 2.7	48.8 ± 29.5	20.0 ± 7.7	13.5 ± 7.8	169.8 ± 73.5	12.7 ± 8.7	0.001	<0.001	N.S.
3,7-Methyluric acid	2.7 ± 1.1	34.6 ± 16.1	20.0 ± 7.7	7.3 ± 2.9	76.6 ± 27.3	14.3 ± 8.6	<0.001	<0.001	N.S.
1,3,7-Methyluric acid	0.7 ± 0.3	7.5 ± 2.6	21.2 ± 6.8	1.8 ± 0.6	18.6 ± 8.1	9.7 ± 6.9	<0.001	<0.001	0.001

^a Values represent mean ± standard deviation. P values were obtained using a mix model (SPSS 19.0 program).

disease, being CF used as a test compound and its clearance used for evaluating liver function (Rodopoulos et al., 1995).

Excretion of all metabolites increased from baseline reaching the highest elimination at time intervals 0–4 and 4–8 h after cocoa consumption, with a further increase in the 12–24 h time interval (Fig. 3), not recovering basal levels after 24 h. These results are in agreement with previous findings suggesting that methylxanthines were metabolized by reactions that occurred simultaneously and not sequentially (Rodopoulos & Norman, 1997; Rodopoulos et al., 1996). In addition, a faster excretion of methylxanthines and methyluric acids was observed in CC-MX intervention than in CC (Table 4); in spite of this, no significant differences in T_{max} were observed between products, with the exception of 1-MX, 1-MU and 1,3,7-MU.

Pharmacokinetics of methylxanthines and methyluric acid excretion were evaluated after the two cocoa interventions. According to the cocoa composition, the higher consumption of TB, as well as CF and TP in CC-MX product was in agreement with significantly higher C_{max} and AUC observed for these compounds and their derived metabolites. The major methylxanthines excreted in urine were TB, 7-MX and 3-MX (Fig. 3, Table 4). Excretion of unmetabolized TB represented 26.9% of the TB ingested after CC consumption and 41.6% after CC-MX, indicating a higher renal clearance of this dimethylxanthine upon higher exposure. There was a shift in the urinary excretion of the two major TB metabolites, 7-MX and 3-MX, with 7-MX representing nearly 50% of the total methylxanthine excretion in the CC intervention vs. barely 32% after CC-MX intake (Fig. 5). This decrease was accompanied by relatively higher excretions of 3-MX and specially TB, which might be suggestive of a potential saturation of the TB biotransformation pathways.

The low urinary excretion of CF compared to other metabolites confirms its almost complete biotransformation. PX, the main derivative metabolite from CF pathway, was the second dimethylxanthine excreted in urine after TB; however this result was expected considering the low proportion of CF present in the two cocoas studied. TP could be detected in urine samples after CC as a product of CF metabolism, whereas after the CC-MX intervention TP excretion increased associated to the higher CF and TP intake in this methylxanthine-rich cocoa. It is not possible to elucidate whether unmetabolized dietary TP was also excreted in urine, although the higher concentrations of 1,3-MU and 1-MU would suggest a rapid metabolism of this compound, being these the major urinary metabolites reported after TP administration (Rodopoulos & Norman, 1997).

Methyluric acids are the last metabolites in the pathways of methylxanthine biotransformation, but in agreement with previous data after coffee supplementation (Schneider et al., 2003; Zydron et al., 2004) their presence in urine could exceed their corresponding precursors. Higher concentrations of 1,3-MU and 1,7-MU than TP and PX,

respectively, were a clear example of the fast biotransformation of dimethylxanthines to dimethyluric acids. This could also explain the higher excretion of 1-MU compared to this precursor, 1-MX. The methyluric derivative from TB, 3,7-MU, had not been previously identified in urine after cocoa or coffee consumption neither after direct theobromine administration via capsule (Rodopoulos et al., 1996), so no data about these metabolite has been found in the literature. There were minor amounts of 1,3,7-MU in urine in accordance to the preferential N-demethylation metabolism of CF (Rodopoulos & Norman, 1994; Rodopoulos et al., 1995). We could not detect the metabolite 6-amino-5[N-methylformylamino]-1-methyluracil (6-AMMU) resulting from the hydrolytic conversion of TB, which has been found to represent up to 11% of the total urinary TB metabolites after the ingestion of capsules containing 500 mg of TB (Rodopoulos et al., 1996).

There is little information in the literature on the bioavailability of cocoa methylxanthines. One bioavailability trial studied the effect of food matrix on CF and TB absorption, showing lower bioavailability of methylxanthines from cola or chocolate compared to capsule administration (Mumford et al., 1996). Ptolemy et al. (2010) studied the disposition of methylxanthines in five subjects on unrestricted diets after consuming two bars of chocolate providing 376 mg TB and 52 mg CF, finding high variations of saliva, plasma and urine TB and CF concentrations 90 min after chocolate intake. Kuwazawa et al. (1999) reported the plasma and urine levels of major metabolites in one subject that consumed 200 mL cocoa providing 315 mg TB and 53 mg CF. These were the only methylxanthines identified in plasma 60 min after intake, with concentrations of 30 μM TB and 3.1 μM CF, lower than those found in the present study 1 h after CC-MX intake (Fig. 2). In a recent study on the urinary metabolome after consumption of 40 g of a cocoa product, TB, CF and other derived methylxanthines were identified by LC-QTOF but not quantified; however, no TP nor trimethyluric acid was observed (Llorach et al., 2009). Therefore, to our knowledge this is the first study evaluating the absorption and elimination of methylxanthines in humans after soluble cocoa consumption along a 24 h intervention. Similarly, these would be the first data identifying PX, TP, 3-MX and 7-MX in plasma after cocoa consumption. In contrast, studies on coffee methylxanthine bioavailability have recently confirmed the absorption of these four minor compounds and their presence in plasma, although with higher T_{max} values (ranging between 4 and 8 h) than those reported here, suggesting a slower metabolism of these compounds after coffee consumption (Lang et al., 2013).

Conclusions

This study evaluated the bioavailability and pharmacokinetic of methylxanthines in humans, and characterized the plasma and urinary

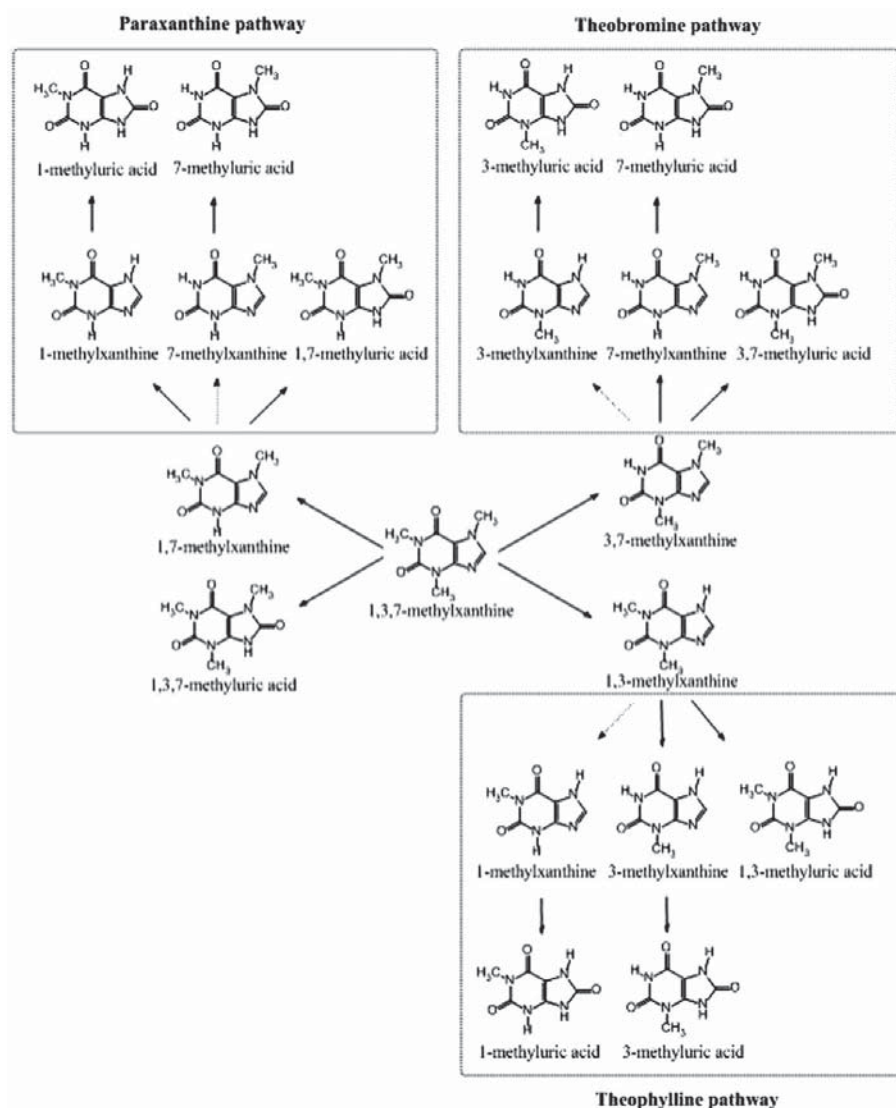


Fig. 4. Biotransformation pathways of methylxanthines and secondary metabolites in human metabolism. Discontinuous lines indicate minor production.

metabolites after consuming realistic doses of two soluble cocoa products with different methylxanthine composition. Metabolism of cocoa methylxanthines in humans has not been widely studied and some results here present are novel findings. Up to 12 different metabolites were identified and quantified in a single run in biological fluids by HPLC-DAD and LC-QTOF. Theobromine was the major methylxanthine both in plasma and urine, with its principal biotransformation products, 7-MX and 3-MX, detected in plasma and as the main urinary metabolites. Results showed a strong dose–response effect after cocoa consumption. It can be concluded that methylxanthines in cocoa are bioavailable, partially metabolized and rapidly eliminated, with a sustained urinary excretion for as long as 24 h after intake.

Acknowledgments

We are grateful to the volunteers participating in the study, as well as the Analysis Service Unit (USTA) facilities of ICTAN for the mass spectrometry analysis, and to Laura Barrios for her statistical assistance. Nutrexp S.L. (Ref. 20100175) is acknowledged for the financial support and for providing the cocoa products. We are also grateful to the Consolider-Ingenio Project (CSD2007-00063) from the Spanish Ministry of Science and Innovation. S.M.-L. is a predoctoral fellow of the JAE Program (JAEPre097) co-funded by CSIC and the European Social Fund. M. G.-J. is a predoctoral FPI fellow BES2008-007138 of the Spanish Ministry of Science and Innovation. L.B.-C. conceived and designed the

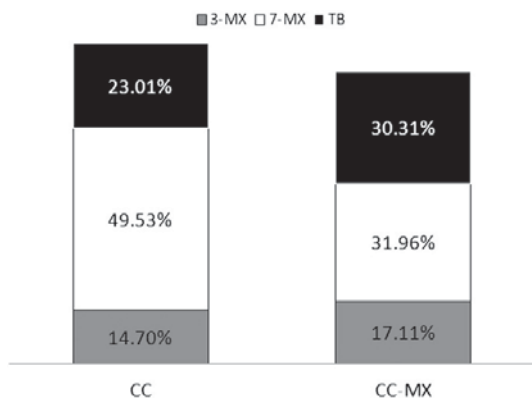


Fig. 5. Relative urinary elimination of TB and its major metabolites, 7-MX and 3-MX, after consuming the control cocoa (CC) and the methylxanthine-rich cocoa (CC-MX) expressed as percentage of the total methylxanthine metabolite excretion.

study. All the authors revised and approved the final version of the manuscript. The authors declare no conflicts of interest.

References

- Apgar, J. L., & Tarka, S. M. (1999). Methylxanthines. In I. Knight (Ed.), *Chocolate and cocoa: Health and nutrition* (pp. 153–173). Oxford, UK: Blackwell Sciences.
- Arnaud, M. J. (2011). Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 200, 33–91.
- Atia, N. N., York, P., & Clark, B. J. (2009). Development and validation of a rapid and efficient method for simultaneous determination of methylxanthines and their metabolites in urine using monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*, 32, 931–938.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of the dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 135–141.
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., & Williamson, G. (2008). Cocoa and health: A decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 1–11.
- Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K., & Lüscher, T. F. (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, 119, 1433–1441.
- Daly, J. W. (2007). Caffeine and analogues: Biomedical impact. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2153–2169.
- De Sena, A. R., Aparecida de Assis, S., & Branco, A. (2011). Analysis of theobromine and related compounds by reversed phase High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection: An update (1992–2011). *Food Technology and Biotechnology*, 49, 413–423.
- Emara, S. (2004). Simultaneous determination of caffeine, theophylline and theobromine in human plasma by on-line solid-phase extraction coupled to reversed-phase chromatography. *Biomedical Chromatography*, 18, 479–485.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO (2003). *Medium-term prospects for agricultural commodities*. Projections to the year 2010. ROME: FAO.
- Georga, K. A., Samanidou, V. F., & Papadoyannis, I. N. (2001). Use of novel solid-phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin. *Journal of Chromatography B*, 759, 209–218.
- Jalil, A. M. M., Ismail, A., Pei, C., Hamid, M., & Kamaruddin, S. H. (2008). Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7877–7884.
- Kuwazawa, T., Seno, H., Lee, X.-P., Akio, I., Watanabe-Suzuki, K., Sato, K., et al. (1999). Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 387, 53–60.
- Lang, R., Dieminger, N., Beusch, A., Lee, Y. M., Dunkel, A., Suess, B., et al. (2013). Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(26), 8487–8503.
- Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Jauregui, O., Monagas, M., & Andres-Lacueva, C. (2009). An LC-MS-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after cocoa consumption. *Journal of Proteome Research*, 8, 5060–5068.
- Martin, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Granado, A. B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., et al. (2008). Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7765–7772.
- Mitchell, E. S., Slettenaar, M., Meer, N., Transler, C., Jans, L., Quadt, F., et al. (2011). Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. *Physiology & Behaviour*, 104, 816–822.
- Mumford, G. K., Benowitz, N. L., Evans, S. M., Kaminski, B. J., Preston, K. L., Santerud, C. A., et al. (1996). Absorption rate of methylxanthines following capsules, cola and chocolate. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 51, 319–325.
- Neufingerl, N., Zebregs, Y., Schuring, E., & Trautwein, E. (2013). Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: A randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(6), 1201–1209.
- Okuro, M., Fujiki, N., Kotori, N., Ishimaru, Y., Sokoloff, P., & Nishino, N. (2010). Effects of paraxanthine and caffeine on sleep, locomotor activity, and body temperature in orexin/ataxin-3 transgenic narcoleptic mice. *Sleep*, 33, 930–942.
- Porikka-Heiskanen, T., Zitting, K. M., & Wigen, H. K. (2013). Sleep, its regulation and possible mechanisms of sleep disturbances. *Acta Physiologica*, 208(4), 311–328.
- Ptolemy, A. S., Tzioumis, T., Thomke, A., Rifai, S., & Kellogg, M. (2010). Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies. *Journal of Chromatography B*, 878, 409–416.
- Rodopoulos, N., Hojvall, L., & Norman, A. (1996). Elimination of theobromine metabolites in healthy adults. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 56, 373–383.
- Rodopoulos, N., & Norman, A. (1994). Determination of caffeine and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 54, 305–315.
- Rodopoulos, N., & Norman, A. (1996). Assessment of dimethylxanthine formation from caffeine in healthy adults: Comparison between plasma and saliva concentrations and urinary excretion of metabolites. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 56, 259–268.
- Rodopoulos, N., & Norman, A. (1997). Elimination of theophylline metabolites in healthy adults. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 57, 233–240.
- Rodopoulos, N., Wisen, O., & Norman, A. (1995). Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 55, 229–242.
- Rodriguez-Ramiro, I., Martín, M. A., Ramos, S., Bravo, L., & Goya, L. (2010). Comparative effects of dietary flavanols on antioxidant defences and their response to oxidant-induced stress on Caco2 cells. *European Journal of Nutrition*, 50, 313–322.
- Rubio, L., Valls, R. M., Macia, A., Pedret, A., Giral, M., Romero, M. P., et al. (2012). Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites. *Food Chemistry*, 135, 2922–2929.
- Sarria, B., Martínez-López, S., Fernandez-Espinosa, A., Gomez-Juriati, M., Goya, L., Mateos, R., et al. (2012). Effects of regularly consuming dietary fibre rich soluble cocoa products on bowel habits in healthy subjects: A free-living, two-stage, randomized, cross-over, single-blind intervention. *Nutrition and Metabolism*, 9, 1–10.
- Schmidt, B., Roberts, R. S., Davis, P., Doyle, L. W., Barrington, K. J., Ohlsson, L., et al. (2006). Caffeine therapy for apnea of prematurity. *The New England Journal of Medicine*, 354, 2112–2121.
- Schneider, H., Ma, L., & Glatt, H. (2003). Extractionless method for the determination of urinary caffeine metabolites using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 789, 227–237.
- Schreiber-Deturmeny, E., & Bruguerolle, B. (1996). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of caffeine and theophylline for routine drug monitoring in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 677, 305–312.
- Smit, H. J., Gaffan, E. A., & Rogers, P. J. (2004). Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology*, 176, 412–419.
- Stavric, B. (1988). Methylxanthines: Toxicity to humans. *Theophylline. Food and Chemical Toxicology*, 26, 541–565.
- Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., Jung, N., & Schöming, E. (2007). Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: A randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 298, 49–60.
- Thevis, M., Opfermann, G., Krug, O., & Schanzwer, W. (2004). Electrospray ionization mass spectrometric characterization and quantization of xanthine derivatives using isotopically labelled analogues: An application for equine doping control analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 1553–1560.
- Usmani, O. S., Belvisi, M. G., Patel, H. J., Crispino, N., Birrell, M. A., Korbonits, M., et al. (2005). Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *The FASEB Journal*, 19(2), 231–233.
- Zamboni, C. G., Aresta, A., & Palmisano, F. (2004). Determination of methylxanthines in urine by liquid chromatography with diode array UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 621–624.
- Zydron, M., Baranowski, J., & Baranowska, I. (2004). Separation, pre-concentration, and HPLC analysis of methylxanthines in urine samples. *Journal of Separation Science*, 27, 1166–1172.

Objetivo 1.2. Estudio farmacocinético de absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas tras el consumo de un producto soluble de café mezcla tostado/verde.

Artículo 2.

Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy humans.

Sara Martínez-López, Beatriz Sarriá, Gema Baeza, Raquel Mateos, Laura Bravo-Clemente

Food Research International (2014), en prensa (doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.043)



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects



Sara Martínez-López, Beatriz Sarriá, Gema Baeza, Raquel Mateos, Laura Bravo-Clemente*

Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 January 2014
Accepted 29 May 2014
Available online 11 June 2014

Keywords:
Green coffee
Human
Methylxanthines
Metabolism

ABSTRACT

Coffee is widely consumed worldwide; therefore, the methylxanthines contained in coffee, mainly caffeine (CF), are among the most abundant bioactive compounds in our diet. In the present work, the bioavailability and metabolism of methylxanthines in a commercial soluble green/roasted coffee blend was studied. After a 3-day restriction of methylxanthine-containing foods, fasting healthy subjects (12 men and women) consumed the coffee product containing 70.69 mg CF and 0.119 mg theobromine (TB). Plasma samples were taken before ($t = 0$ h) and after coffee consumption at different time points (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 and 12 h). Urine was collected at baseline (-2 – 0 h) and at different intervals (0–2, 2–5, 5–8, 8–12 and 12–24 h). Samples were analyzed by HPLC-DAD and LC-MS-QToF, and pharmacokinetic parameters were calculated. CF was the main methylxanthine found in plasma ($C_{max} = 10.50 \mu\text{M}$, $T_{max} = 1.2$ h). In addition, seven methylxanthines and methyluric acids were detected between 0.5 and 12 h after coffee intake, paraxanthine (PX) being the major metabolite ($C_{max} = 3.36 \mu\text{M}$), followed by 1-methyluric acid (1-MU; $C_{max} = 1.44 \mu\text{M}$) and 1-methylxanthine (1-MX; $C_{max} = 1.27 \mu\text{M}$), identified in plasma samples for the first time. In 24 h urine, eleven methylxanthines and methyluric acids were detected, 1-MU being the major metabolite ($C_{max} = 150.52 \mu\text{M}$, $T_{max} = 12$ h) amounting to 67.7% of the total urinary metabolites. In conclusion, a rapid absorption, metabolism and excretion of caffeine and its derived methylxanthines and methyluric acids have been observed after consumption of a green/roasted coffee product.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coffee is one of the most widely consumed beverages worldwide. Its distinctive aroma and its well-known stimulating effects have made it one of the most popular beverages. Coffee can be consumed as an infusion or mixed with milk, and often sugar, chocolate, cream or liquor are added depending on cultural traditions and individual preferences. Coffee consumption varies widely between countries: in 2011 Switzerland and Scandinavian countries showed the highest consumption, over 6 kg/person/year. The present consumption in Spain is 4.2 kg/person/year (www.ico.org).

Coffee is rich in different bioactive compounds, specially methylxanthines and polyphenols. Caffeine is the major methylxanthine in coffee, this beverage being the main dietary source of this bioactive compound. In coffee seeds, caffeine content ranges between 10 and 20 g/kg together with trace amounts of theobromine and theophylline (Koleva, van Beek, Soffers, Dusemund, & Rietjens, 2012). In soluble roasted coffee, caffeine concentrations as high as 771.4 $\mu\text{g/mL}$ have been reported, with minor

amounts of the dimethylxanthines theobromine (11.50 $\mu\text{g/mL}$) and theophylline (0.06 $\mu\text{g/mL}$) (Aragao, Veloso, Bispo, Ferreira, & de Andrade, 2005). Alonso-Salces, Guillou, and Berrueta (2009) observed caffeine concentrations between 10.5 and 17.4 g/kg dry weight in Arabica (*Coffea arabica*) green coffee beans. In addition to agricultural and geographical factors, methylxanthine content in coffee depends on the mode of preparation, with instant coffee having higher caffeine concentrations than filtered coffee (Samanidou, Tsiagiannidis, & Sarakatsianos, 2012). In terms of consumption, a cup of instant coffee (225 mL) contains between 60 and 85 mg of caffeine, whereas a cup of espresso coffee (28 mL) shows between 30 and 50 mg of caffeine (Crozier, Stalmach, Lean, & Crozier, 2011). Concentration of phenolic compounds in green coffee beans may range between 6 and 10% (dry weight) (Chu et al., 2009), being mostly hydroxycinnamic acids (chlorogenic acids). Other minor components such as terpenoids (cafestol and kahweol) and potassium have been found in 0.6% and 2.5% dry matter, respectively (Bonita, Mandarano, Shuta, & Vinson, 2007).

In the past, coffee consumption was associated with unfavorable effects on vascular function, increasing blood pressure, plasma cholesterol or LDL oxidation in healthy humans (Bonita et al., 2007). However, the negative effects associated with coffee consumption have been questioned and its perception changed in recent years. In 2008 the World Anti-Doping Agency (WADA) excluded caffeine from the

* Corresponding author at: Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), C/José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 915445607.
E-mail address: lbravo@ictan.csic.es (L. Bravo-Clemente).

“Prohibited List—International Standards”. An epidemiological study suggested that cardiovascular benefits are associated with moderate coffee consumption (<6 cups/day; Bonita et al., 2007). A meta-analysis based on five epidemiological studies has recently shown that moderate consumption of coffee (4 servings per day) was inversely associated with the risk of heart failure (Mostofsky, Rice, Levitan, & Mittleman, 2012). Additionally, coffee also seems to reduce inflammation (Kempf et al., 2010), although further research is necessary to better understand this effect (Frost-Meyer & Logomarsino, 2012). Recently, other authors have pointed to beneficial health effects such as decreasing the risk of type 2 diabetes mellitus in overweight volunteers who consumed 5 cups/day (Weedick et al., 2011) or pain alleviation in patients with advanced cancer (Suh et al., 2013).

Although most of the health effects indicated above have been attributed to coffee's polyphenol content (Bravo, Sarriá, Gómez-Juaristi, Martínez-López, & Mateos, 2010), methylxanthines may also play a role, since these compounds have already shown an improvement in antioxidant status in humans (Azam, Hadi, Khan, & Hadi,

2003; Gómez-Ruiz, Leake, & Ames, 2007), as well as vasodilation and cardiac-stimulation (Riksen, Smits, & Rongen, 2011) and HDL-cholesterol raising effects (Neufingerl, Zebregs, Schuring, & Trautwein, 2013). The most widely known positive effects of caffeine are its stimulatory effect on the central nervous system, improved physical performance and alertness, and its ability to enhance mood and well-being feeling (Kaplan et al., 1997), equally affecting habitual consumers and abstainers (Haskell, Kennedy, Wesnes, & Scholey, 2005).

Health effects associated with coffee consumption largely depend on the bioavailability and biotransformation of its bioactive components in the organism. Pathways of caffeine metabolism were recently reviewed by Arnaud (2011) and are presented in Fig. 1. Caffeine (CF, 1,3,7-methylxanthine) is completely absorbed in the gastrointestinal tract and rapidly reaches the liver, where it is metabolized by cytochrome P450 yielding three major dimethylxanthine metabolites: paraxanthine (PX, 1,7-methylxanthine), theobromine (TB, 3,7-methylxanthine) and theophylline (TP, 1,3-methylxanthine) in the proportion of 80:12:7 (Atia, York, & Clark, 2009), and to a lower extent to trimethylated urate,

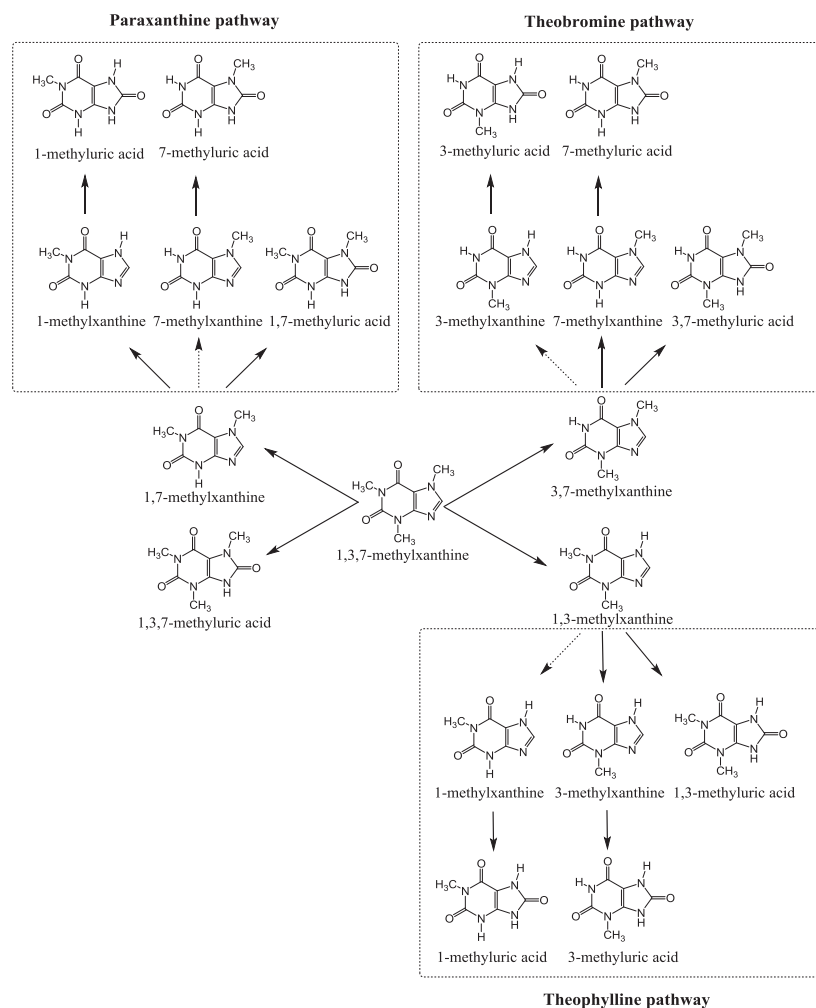


Fig. 1. Metabolic pathways of caffeine and its metabolites.

1,3,7-methyluric acid (1,3,7-MU). Additionally, a small percentage of the ingested dose is eliminated in urine as unchanged CF. Further metabolism results in secondary metabolites such as monomethylxanthines (1-MX, 1-methylxanthine; 3-MX, 3-methylxanthine; 7-MX, 7-methylxanthine), dimethylurate derivatives (1,3-MU, 1,3-methyluric acid; 1,7-MU, 1,7-methyluric acid) and monomethylurates (1-MU, 1-methyluric acid). In contrast, 3-methyluric, 7-methyluric and 3,7-methyluric acids, which mainly originate from the dimethylxanthines TB and TP, have not been reported after coffee consumption.

Several studies focusing on the bioavailability of polyphenols in coffee have been carried out (Monteiro, Farah, Perrone, Trugo, & Donangelo, 2007; Renouf et al., 2014; Stalmach et al., 2009). However, knowledge on the bioavailability and metabolism of methylxanthines after coffee consumption is scarce. An early study on coffee methylxanthine bioavailability was performed in one single volunteer (Kuwazawa et al., 1999). Schneider, Ma, and Glatt (2003) reported the metabolites excreted in urine in a fixed time (4–5 h) after a single oral dose of coffee (providing 4 mg CF per kg body weight) consumed by 5 volunteers. Two recent studies reported the maximum concentration of caffeine (Teekachunhatean, Tosri, Rojanasthien, Srichairatanakool, & Sangdee, 2013) or caffeine and its metabolites in plasma (Lang et al., 2013), not determining the urinary excretion of methylxanthines. Therefore, the aim of this work was to study the absorption and metabolism of coffee methylxanthines in healthy subjects after consuming a soluble coffee product recently commercialized which is a blend of green and roasted coffee, and it is of interest from a nutritional viewpoint given its higher concentration of bioactive compounds compared to roasted coffee. The pharmacokinetic values of caffeine and its metabolites in plasma and urine are provided.

2. Material and methods

2.1. Chemical reagents

The green and roasted coffee blend used in this study (Green Blend®) has been produced and commercialized by Nestlé S.A. Perchloric acid, formic acid and HPLC grade eluents (methanol and acetonitrile) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Methylxanthine and methyluric acid standards (caffeine, paraxanthine, theobromine, theophylline, 1-methylxanthine, 3-methylxanthine, 7-methylxanthine, and the acids 1-methyluric, 1,3-dimethyluric, 1, 7-dimethyluric and 3,7-dimethyluric) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2. Study design

The study followed the Ethical Recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta del Hierro (Madrid, Spain). Volunteer recruitment was carried out by placing advertisements at the Complutense University campus. The inclusion criteria were as follows: body mass index (BMI) 18–25 kg/m², age 18–45 years old, non-smokers, non-vegetarian, non-pregnant women, not suffering chronic pathologies or disorders, and not having consumed vitamins or dietary supplements in the previous 6 months. Twelve subjects who fulfilled the inclusion criteria agreed to participate in the study and gave informed written consent. Baseline characteristics of the subjects are summarized in Table 1.

Three days before the beginning of the study, volunteers were asked to maintain their habitual diet abstaining from methylxanthine and polyphenol-rich foods, such as coffee, cocoa, chocolate products, tea, yerba mate and caffeine-containing refreshments in order to reduce inter and intraindividual differences in methylxanthine intake. To detect any possible food restriction incompliance, volunteers were asked to complete a 72 h detailed food intake report on those three days, specifying the ingredients and amount of food consumed, as well as the cooking procedure used. The program DIAL [Department of Nutrition and Bromatology I, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid (UCM), Spain] was used to assess the macronutrient intake composition. Results are shown in Table 2.

On the intervention days, volunteers remained at the Human Nutrition Unit of ICTAN for 12 h. After an overnight fast, blood pressure (BP) and heart rate were measured in triplicate after a 5 min rest using an automatic arm sphygmomanometer (Pic Indolor Diagnostic, BS 150, Artsana, Italy); weight and height were also measured (Table 1). Before consuming the coffee beverage, a nurse inserted a cannula in the cubital vein of the non-prevailing arm and a blood sample was collected in EDTA-coated tubes ($t = 0$ h). Subsequently, 3.5 g of the soluble green-roasted coffee product dissolved in 250 mL of hot water were provided to the volunteers, who drank the beverage within the following 5 min. Blood samples were collected 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 12 h after coffee consumption and immediately centrifuged (10 min, 3000 rpm, 4 °C). Plasma aliquots were separated and stored at -80 °C until analysis. Urine samples were simultaneously collected in 24 h urine containers at different intervals: between -2 and 0 h before coffee intake and at $0-2$, $2-5$, $5-8$, $8-12$, and $12-24$ h after. Urine volumes were recorded and homogenized aliquots were taken and stored at -20 °C for further analysis. Methylxanthine-free meals were provided for breakfast, lunch and afternoon snack at 2, 6 and 10 h after coffee consumption, respectively, and water and isotonic beverages were supplied ad libitum. Volunteers were instructed to eat a methylxanthine-free dinner that night, and to bring the $12-24$ h urine sample to ICTAN the following morning.

2.3. Coffee composition

Bioactive composition of the soluble coffee was determined following procedures previously developed by our team. Methylxanthines naturally present in coffee were extracted (Bravo & Saura-Calixto, 1998) and analyzed by HPLC-DAD following a method based on Martin et al. (2008). Separation was carried out in a 1200 series equipment (Agilent Technologies) with UV detection at 272 nm working at a 0.6 mL/min flow rate. A Superspher 100 RP-18 column (250 mm, 4 µm, Merck) protected with an ODS RP18 guard column was used to separate the analytes. Commercial standards of caffeine, theobromine and theophylline were used to identify and quantify methylxanthine contents of coffee extracts.

The green/roasted coffee blend contained 0.034 ± 0.004 and 20.197 ± 1.787 mg/g of theobromine and caffeine, respectively; therefore, the 3.5 g dose ingested provided 0.119 mg TB and 70.69 mg CF.

2.4. Sample preparation

Methylxanthines in plasma were extracted following an analytical procedure based on acid precipitation (Schreiber-Deturmeny &

Table 1
Basal characteristics of the individuals who participated in the study.

	Age (years)	Weight (kg)	Height (m)	BMI (kg/m ²)	Diastolic BP (mm Hg)	Systolic BP (mm Hg)	Heart rate (beats per min)
Men (n = 7)	27.86 ± 3.48	68.43 ± 9.96	1.71 ± 0.07	23.42 ± 2.52	124.60 ± 8.20	76.40 ± 5.50	62.60 ± 8.79
Women (n = 5)	28.80 ± 3.56	66.00 ± 13.27	1.71 ± 0.08	22.43 ± 3.33	121.14 ± 16.01	74.29 ± 11.80	75.43 ± 4.76

Values represent mean ± standard deviation (BMI: body mass index; BP: blood pressure).

Table 2

Macronutrient intake of volunteers according to the 72 h records before the intervention.

	Energy (kcal/day)	Proteins (g/day)	Carbohydrates (g/day)	Lipids (g/day)	Cholesterol (mg/day)
Men (n = 7)	2895 ± 319	119 ± 27	242 ± 84	117 ± 18	381 ± 131
Women (n = 5)	2206 ± 401	90 ± 26	210 ± 43	105 ± 30	310 ± 110

Values represent mean ± standard deviation.

Bruguierolle, 1996). Protein was precipitated by adding 40 µL of 20% perchloric acid to 100 µL plasma (final concentration 5.7% HClO₄). Samples were vortexed, centrifuged (10 min, 10,500 rpm, 4 °C) and supernatants were collected. Urine samples were directly centrifuged (10 min, 12,500 rpm, 4 °C) and filtered using 0.45 µm pore-size cellulose-acetate membrane filters (Albet). Samples (25 µL of extracted plasma and untreated urine) were analyzed in duplicate by HPLC-DAD.

2.5. Liquid-chromatography

Methylxanthines and methyluric acids were simultaneously analyzed by HPLC in a 1200 series system (Agilent Technologies) and a total of eleven metabolites were separated using a Kinetex 100 C18 column (4.6 × 250 mm, 5 µm; Phenomenex) with an AJO-9000 holder and AJO-5768 C18 pre-column. Separation of methylxanthines and metabolites was performed with a gradient elution in a ternary system using 1% formic acid in micro-filtered water (solvent A), methanol (solvent B) and acetonitrile (solvent C) at a constant flow rate of 0.7 mL/min at 25 °C. The mobile phase program is shown in Table 3. Methylxanthines and methyluric acids were detected at 272 and 289 nm, respectively, in a diode-array-detector (DAD), and their identification in human plasma and urine was carried out comparing retention times and UV spectra with standards. Calibration curves were prepared to quantify methylxanthines and methyluric acids. Standards were dissolved in micro-filtered water, except for 1-methyluric acid that required 10% methanol for complete dissolution. Due to the lack of 1,3,7-trimethyluric acid commercial standard, this metabolite was quantified as equivalents of caffeine. Urine results were normalized considering the total volume excreted at each time point studied.

2.6. Mass spectrometry

Most analytes were identified by comparison with their respective commercial standards; however, the lack of 1,3,7-MU standard required its unequivocal identification by mass spectrometry. This technique also allowed confirming the identity of the rest of the metabolites.

Analyses were carried out in a 1200 LC-DAD system coupled to an Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-ToF) detector with electrospray ionization (ESI)-Jet Stream Technology (Agilent Technologies). The LC-DAD method described above was applied using the Kinetex 100 C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm; Phenomenex) column and

Table 3

Chromatographic mobile phase program used to analyze methylxanthines and methyluric acids in plasma and urine samples.

Time (min)	% solvent A	% solvent B	% solvent C
0	99	1	0
2	95	4.5	0.5
30	90	9	1
33	85	13.5	1.5
38	65	31.5	3.5
40	0	90	10
43	0	90	10
45	99	1	0
50	99	1	0

Solvent A: 1% formic acid in micro-filtered water; solvent B: methanol; solvent C: acetonitrile.

20 µL of the sample was injected. The Q-ToF acquisition conditions were as follows: ESI source operated in positive ion mode programming temperature and gas flow at 325 °C and 10 mL/min, respectively, and 25 psig of nebulizer pressure. Cap, nozzle and fragmentor voltages were programmed to 3500, 500 and 150 V, respectively. Mass range was set between 100 and 930 m/z. Mass Hunter Workstation Software was used to process data.

2.7. Pharmacokinetic and statistical analysis

Maximum concentration (C_{max}), area under curve (AUC) and time to reach maximum concentration (T_{max}) of methylxanthines and metabolites in plasma and urine were evaluated using Microsoft Excel functions (Usansky, Desai, & Tang-Liu, 2011). Results were statistically analyzed using the program SPSS 19.0. A one-way ANOVA test was applied to study the differences between baseline values and those obtained at each time point. The significance level was established at p < 0.05. Data are given as mean ± standard deviation.

3. Results and discussion

3.1. Methylxanthine determination in plasma

Most reports in the literature on caffeine bioavailability come from studies using pure caffeine in solution, capsules, tablets, etc. (Blanchard & Sawers, 1983; Mumford et al., 1996; Rodopoulos & Norman, 1996; Rodopoulos, Wisen, & Norman, 1995). Mumford et al. (1996) observed lower bioavailability of methylxanthines in a cola drink or chocolate bar compared to capsule administration, pointing out the importance of studying the bioavailability of dietary methylxanthines in the food or beverage as consumed. Few works studied the bioavailability and metabolism of coffee methylxanthines in humans, generally assessing the concentration of CF and its primary metabolites, PX, TB and TP in plasma (Lang et al., 2013; Teekachunhatean et al., 2013) or in urine (Schneider et al., 2003). However, to our knowledge no previous studies have evaluated the absorption, metabolism and elimination of CF and its metabolites in plasma and urine in healthy subjects after consumption of a green/roasted coffee blend providing realistic doses of CF.

The methodology used for the extraction of methylxanthines and their metabolites in plasma was based on Schreiber-Deturmeny and Bruguierolle (1996) with small modifications. According to Aragao et al., (2005), methylxanthines need acid pH to ionize and obtain the best interaction with C18 reverse phases. Therefore, in order to prepare plasma samples for methylxanthine analysis, precipitation was performed with 20% perchloric acid instead of using organic solvents as proposed by other authors (Georga, Samanidou, & Papadopoulos, 2001; Leakey, 1990).

A 50 min single-run HPLC-DAD method was used to analyze methylxanthines in plasma. CF, together with other seven metabolites was identified in the postprandial plasma samples: the dimethylxanthines PX, TB and TP, the monomethylxanthines 1-MX and 7-MX, and the methyluric acids 1-MU and 1,7-MU. The concentration of each metabolite in plasma was calculated using the corresponding calibration curves to quantitatively evaluate the absorption and metabolism of these compounds. The absorption rates are graphically represented in Fig. 2. CF was the main methylxanthine found in plasma, followed by its major metabolite, PX, and 1-MU, 1-MX, TB, TP, 7-MX, and 1,7-MU, the latter showing high interindividual variability being present only in 8 volunteers. This outcome is in accordance with Lang et al. (2013), who found all these metabolites, except for 1-MX and 1-MU, in plasma after the intake of coffee containing up to 224 mg of CF. 1-MX and 1-MU had been previously detected in urine samples after the intake of high doses of CF (Rodopoulos et al., 1995; Schneider et al., 2003); however, to our knowledge, this is the first work reporting the presence of 1-MX and its methyluric acid metabolite, 1-MU, in plasma.

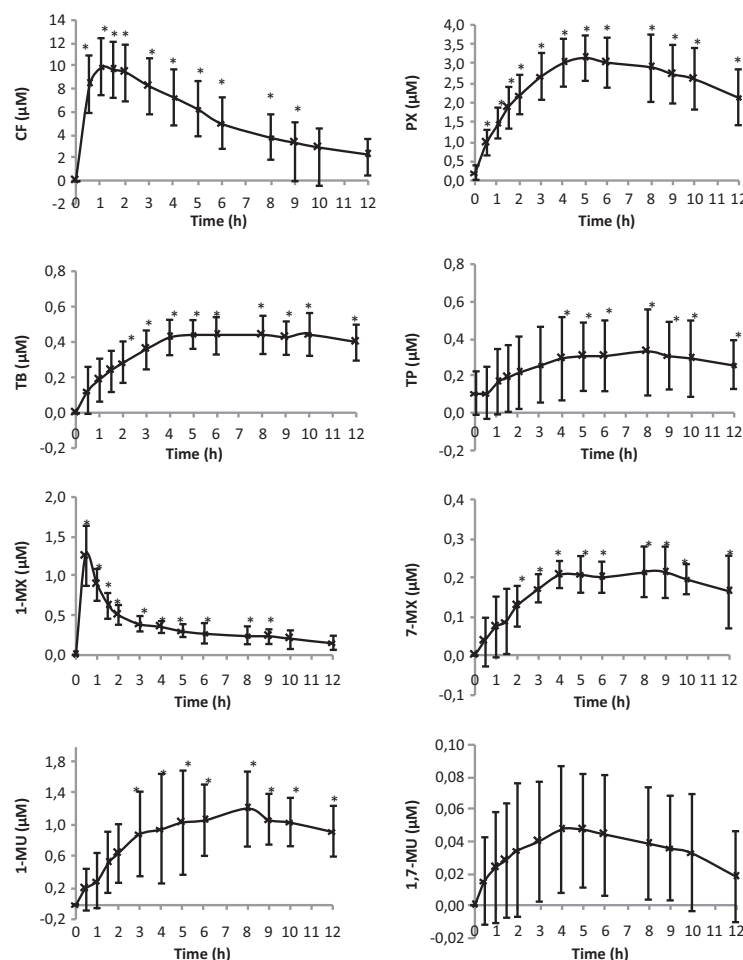


Fig. 2. HPLC-DAD determination of methylxanthines (CF: caffeine; PX: paraxanthine; TB: theobromine; TP: theophylline; 1-MX: 1-methylxanthine; 7-MX: 7-methylxanthine) and methyluric acids (1-MU: 1-methyluric acid; 1,7-MU: 1,7-methyluric acid) in human plasma after consuming the green/roasted coffee blend. Results were statistically studied with a one-way ANOVA test (significance level $p < 0.05$). Statistical differences between each time point and baseline are marked with asterisks.

All metabolites were detected from the first sampling time (30 min after coffee consumption) up to 12 h. CF and 1-MX peaked at 1 and 0.5 h, respectively; however, none of the detected methylxanthines or methyluric acids returned to basal levels at the end of the intervention. The rapid absorption of CF observed in this study and the progressive biotransformation into its metabolites are in agreement with the known metabolic behavior of this alkaloid in humans. In baseline plasma samples, low levels of PX and TP were observed in most of the volunteers in spite of dietary restrictions. Other authors have also found these dimethylxanthines in fasting plasma samples after food restriction (Lelo, Miners, Robson, & Birkett, 1986; Martínez-López et al., 2014), which might be accounted for slow metabolism and low renal clearance of dimethylxanthines in comparison with monomethylxanthines and methyluric acids (Arnaud, 2011).

CF showed a rapid absorption and metabolization to PX and 1-MX. In fact, 30 min after coffee consumption the concentration of these three compounds was statistically higher than baseline values, showing a fast biotransformation of CF following the PX pathway (Fig. 2). In

contrast, TB and TP pathways required longer times, with TB and 7-MX not reaching statistical differences with respect to basal levels until 2 h after intake, and up to 4 h in the case of TP.

The C_{max} , T_{max} and AUC parameters of the eight analytes found in plasma after consumption of the green/roasted coffee blend are shown in Table 4. CF showed maximum plasma concentration ($10.5 \mu\text{M}$) 1.2 h after coffee consumption, in agreement with that reported by Teekachunhatean et al. (2013), who observed similar maximum concentrations of CF ($12.7 \mu\text{M}$) 44 min after consuming a coffee product containing 96 mg of CF, and with Perera, Gross, and McLachlan (2010) that found a C_{max} of $10.3 \mu\text{M}$ after consuming 100 mg CF. However, higher doses resulted in increased plasma concentrations of CF. In a study in one single volunteer consuming coffee containing 375 mg of CF, a C_{max} of $24.2 \mu\text{M}$ was reported (Kuwazawa et al., 1999). Similarly, the intake of 300 mg of pure CF resulted in a plasmatic concentration of $54.5 \mu\text{M}$ (Alvi & Hammami, 2011), while the study by Lang et al. (2013) showed a C_{max} of $32.9 \mu\text{M}$ after consuming a coffee brew containing 224 mg CF. This suggests that consumption of high amounts of

Table 4Pharmacokinetic parameters (C_{\max} , AUC and T_{\max}) of metabolites detected in plasma and urine after coffee consumption.

Metabolite	Plasma			Urine		
	C_{\max} (μM)	AUC ($\mu\text{M}/\text{h}$)	T_{\max} (h)	C_{\max} (μM)	AUC ($\mu\text{M}/\text{h}$)	T_{\max} (h)
CF	10.50 \pm 2.42	69.71 \pm 20.45	1.21 \pm 0.50	4.12 \pm 1.57	54.48 \pm 24.31	6.00 \pm 2.71
PX	3.36 \pm 0.55	30.05 \pm 5.89	6.42 \pm 2.61	12.56 \pm 4.39	186.74 \pm 44.05	12.00 \pm 4.18
TB	0.51 \pm 0.08	4.56 \pm 1.03	7.08 \pm 2.43	9.23 \pm 4.49	142.94 \pm 62.98	20.40 \pm 5.80
TP	0.39 \pm 0.21	3.18 \pm 2.17	8.42 \pm 3.18	1.16 \pm 0.80	12.68 \pm 7.77	14.64 \pm 6.36
1-MX	1.27 \pm 0.35	4.26 \pm 1.15	0.54 \pm 0.14	19.47 \pm 9.61	308.06 \pm 125.7	12.00 \pm 8.56
3-MX	n.d.	n.d.	n.d.	7.39 \pm 5.98	88.75 \pm 59.64	18.25 \pm 8.52
7-MX	0.26 \pm 0.05	2.01 \pm 0.48	8.08 \pm 1.62	11.98 \pm 6.41	153.81 \pm 62.73	20.73 \pm 5.61
1-MU	1.44 \pm 0.57	11.42 \pm 3.22	7.25 \pm 2.63	150.52 \pm 34.77	2238.66 \pm 444.0	16.00 \pm 5.91
1,3-MU	n.d.	n.d.	n.d.	1.76 \pm 0.53	23.76 \pm 5.75	19.64 \pm 6.05
1,7-MU	0.06 \pm 0.04	0.41 \pm 0.33	5.50 \pm 3.30	7.64 \pm 2.10	114.06 \pm 16.64	17.42 \pm 7.14
1,3,7-MU	n.d.	n.d.	n.d.	1.30 \pm 0.71	12.78 \pm 4.48	15.00 \pm 7.47

Values represent mean \pm standard deviation. CF: caffeine; PX: paraxanthine; TB: theobromine; TP: theophylline; 1-MX: 1-methylxanthine; 7-MX: 7-methylxanthine; 1-MU: 1-methyluric acid; 1,7-MU: 1,7-methyluric acid; 1,3,7-MU: 1,3,7-trimethyluric acid. n.d.: not detected.

methylxanthines could lead to a saturation process in their metabolism, significantly affecting the results. Thus, linear pharmacokinetics could be observed with CF intakes between 70 and 100 mg, whereas doses ranging between 250 and 500 mg showed a non-linear kinetic and prolonged half-life (Kaplan et al., 1997). Bearing this in mind, the doses administered in this study (70.69 mg CF) were appropriate to observe a linear pharmacokinetic response, concordant with a realistic intake. In a previous work with a soluble cocoa product enriched in methylxanthines, a dose of cocoa providing 75.7 mg CF resulted in a

C_{\max} for this methylxanthine of 12.1 μM at 2 h, comparable to the results obtained in the present work (Martínez-López et al., 2014).

In agreement with other authors (Lang et al., 2013; Lelo et al., 1986), the main metabolite resulting from CF metabolism is PX, showing a C_{\max} of 3.36 μM 6.4 h after coffee consumption. Similar results were reported by Perera, Gross, Xua, and McLachlan (2011), who observed a peak concentration of PX (2.8 μM) 6 h after orally consuming a tablet of 100 mg CF. The mono-methyluric acid 1-MU showed a slightly higher concentration compared to its precursor, 1-MX (C_{\max} of 1.44 μM vs. 1.27 μM ,

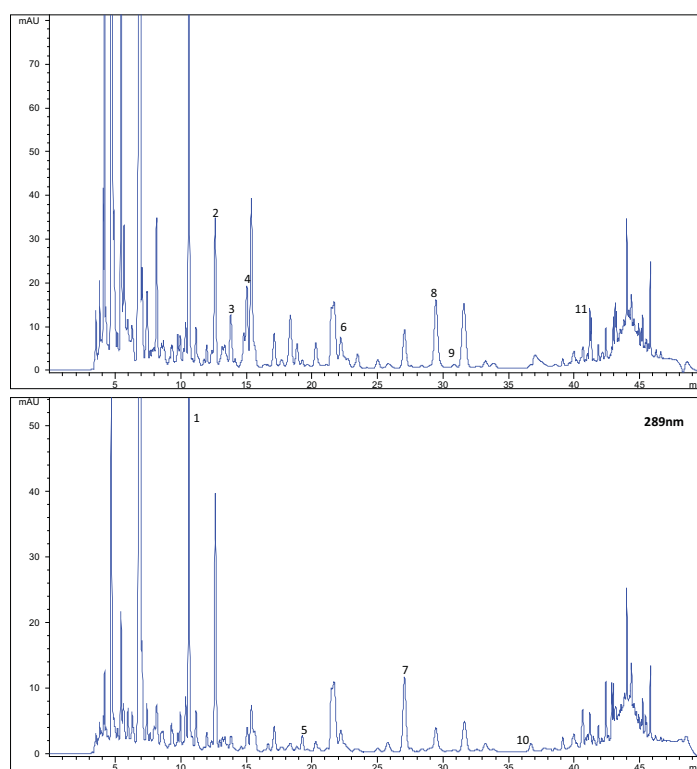


Fig. 3. Representative chromatogram of a urine sample obtained from a volunteer after consuming the green/roasted coffee blend. Methylxanthines and methyluric acids were registered at 272 nm (upper panel) and 289 nm (lower panel). Peak identification: (1) 1-methyluric acid, (2) 7-methylxanthine, (3) 3-methylxanthine, (4) 1-methylxanthine, (5) 1,3-methyluric acid, (6) theobromine, (7) 1,7-methyluric acid, (8) paraxanthine, (9) theophylline, (10) 1,3,7-methyluric acid, (11) caffeine.

respectively) (Table 4); however, both compounds had very different T_{max} values (7.25 and 0.5 h, respectively). Methyluric acids, as the final products in the metabolic transformations of methylxanthines, are usually formed at longer times. The only other work in the literature reporting the presence of CF methyluric metabolites in plasma only found 1,7-MU (0.15 μM), with a T_{max} of 8 h (Lang et al., 2013);

comparatively, we found this compound at a shorter time ($T_{max} = 5.5$ h) and in lower concentration (C_{max} below 0.1 μM). These same authors found TB and TP in the range of 0.5–0.7 μM , and minor amounts of 3-MX and 7-MX (0.05–0.07 μM); in turn, plasma C_{max} concentrations of the dimethylxanthines and 7-MX in the present study ranged between 0.3 and 0.5 μM , while no 3-MX could be detected (Table 4).

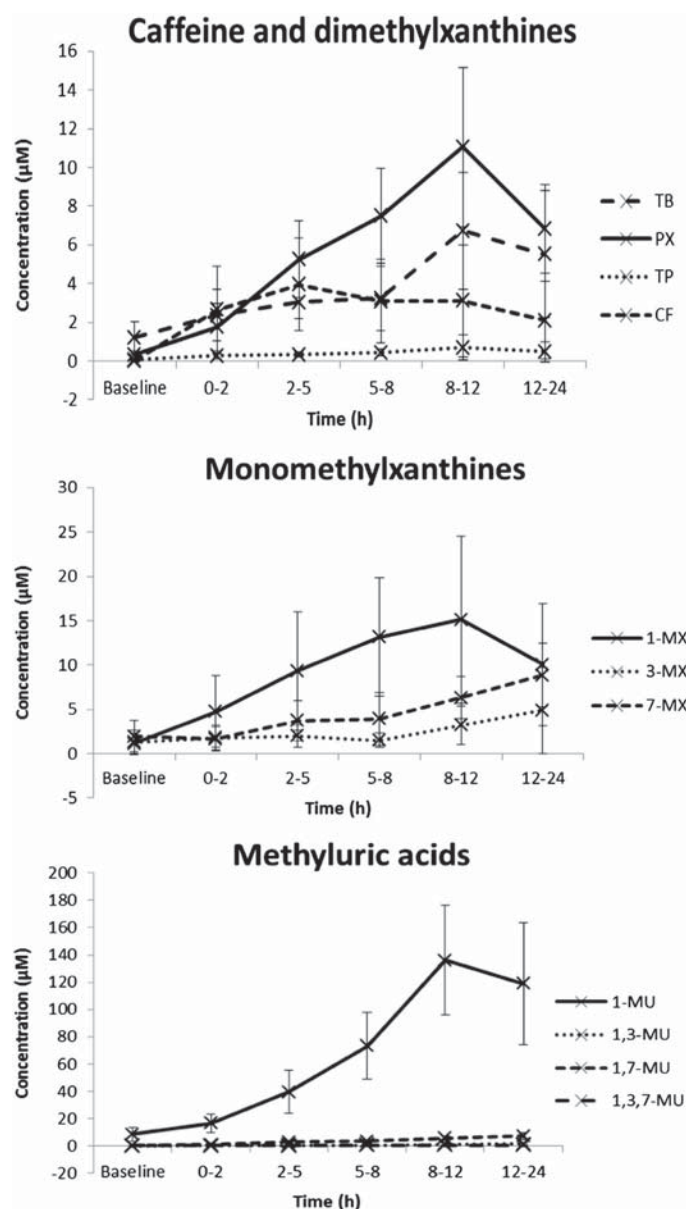


Fig. 4. Urinary excretion of methylxanthines and methyluric acids (CF: caffeine; PX: paraxanthine; TB: theobromine; TP: theophylline; 1-MX: 1-methylxanthine; 3-MX: 3-methylxanthine; 7-MX: 7-methylxanthine; 1-MU: 1-methyluric acid; 1,3-MU: 1,3-methyluric acid; 1,7-MU: 1,7-methyluric acid; 1,3,7-MU: 1,3,7-methyluric acid).

3.2. Methylxanthine determination in urine

Analysis of methylxanthines and methyluric acids in urine is commonly performed after solid phase extraction (Atia et al., 2009; Georga et al., 2001; Schneider et al., 2003; Zydron, Baranowski, & Baranowska, 2004), although nowadays there is increasing interest in reducing sample treatment. In the present work, urine samples were directly analyzed by HPLC with DAD or MS detection without previous solvent extraction. A representative chromatogram of a urine sample is shown in Fig. 3. Besides the methylxanthines already identified in plasma (CF, the dimethylxanthines PX, TB and TP, the monomethylxanthines 1-MX and 7-MX, and the methyluric acids 1-MU and 1,7-MU), three new metabolites were detected in urine: 3-MX, and 1,3-MU and 1,3,7-MU.

The concentrations of the identified metabolites in descending order are 1-MU \gg 1MX > PX > 7-MX > TB > 1,7-MU > 3-MX > CF > 1,3-MU > 1,3,7-MU > TP (Table 4). The high urinary concentration of 1-MU and relatively high C_{max} of 1-MX and PX are in agreement with the literature that describes the PX pathway as the main biotransformation route for CF (Arnaud, 2011). However, the other two monomethylxanthines detected (7-MX and 3-MX), which mainly originate from TB and TP biotransformation, respectively (Fig. 1), were found in lower proportions. These results are in agreement with those observed by Bonati et al. (1982) and Schneider et al. (2003) who described that 1-MU was the major urinary metabolite after consuming caffeine beverages providing 5 mg/kg and 4 mg/kg body mass of caffeine, respectively.

In the present study, in accordance with the higher urinary levels of PX than TP, their respective dimethyluric acid derivatives followed the same trend, 1,7-MU concentration being higher than 1,3-MU. In contrast, in spite of detecting TB at higher concentrations than TP, 3,7-MU was not detected in urine, suggesting a lower yield of the metabolic C8-hydroxylation of TB to form the corresponding methyluric acid as compared with PX and TP. In humans, the cytochrome P450 isoform CYP1A2 is involved in the metabolism of methylxanthines. N3-Demethylation of CF to PX is selectively catalyzed by CYP1A2, which is also involved in N1- and N7-demethylation, and C8-hydroxylation of CF and the different dimethylxanthines. This last reaction is also catalyzed by other P450 isoforms (CYP2A6 in the biotransformation of PX to 1,7-MU, CYP2E3 in the case of 3,7-MU formation from TB, and CYP2E1 and CYP3A4 for TP hydroxylation to 1,3-MU) (Kot & Daniel, 2008). Differences in the activity of the other P450 isoforms might account for the different levels of methyluric acids excreted in urine after coffee consumption.

On the other hand, CF was also converted to 1,3,7-MU, which was excreted in urine in minor amounts (Table 4). In agreement with results reported by other authors, the monomethyluric acids 3-MU and 7-MU were not detected in urine (Bonati et al., 1982; Schneider et al., 2003). Conversely, these metabolites were found in the urine of subjects who received a 200 mg oral dose of pure CF (Rodopoulos et al., 1995). These authors and others in a study providing 4 mg CF/kg body weight (Schneider et al., 2003) also found the metabolites 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU) and 5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil (AAMU), which were not detected in the present study suggesting that higher CF consumption is required to detect these minor urinary metabolites.

The pharmacokinetic parameters C_{max} , T_{max} and AUC were calculated for each metabolite detected in urine and results are shown in Table 4. C_{max} and AUC showed the same trend, with the highest values corresponding to 1-MU, followed by 1-MX, PX, 7-MX, TB, 1,7-MU, 3-MX, CF, 1,3-MU, 1,3,7-MU, and TP in descending order. T_{max} ranged between 6 and 20 h after coffee consumption, with CF showing the lowest T_{max} value in agreement with its rapid absorption. In contrast, TB and 7-MX were the metabolites with the highest T_{max} values (about 20 h). CF and dimethylxanthines have relatively low renal clearance in comparison with monomethylxanthines and methyluric acids, since the former are extensively reabsorbed in the renal tubule (Arnaud,

2011; Rodopoulos et al., 1995). However, in the present work, CF, PX and TP showed shorter T_{max} than their corresponding monomethylxanthines and methyluric acid derivatives (Table 4). These compounds peaked in urine nearly 5–6 h after their maximum plasma levels, while the highest urinary excretion of monomethylxanthines and methyluric acids occurred in general 12 h after peak plasma concentrations (Table 4, Fig. 4). This is in agreement with previous findings from our group in a study with a soluble cocoa product containing 75.7 mg CF (Martínez-López et al., 2014). In this work, maximum CF, TB and TP urinary levels occurred at 7.7 h after cocoa consumption, which is 4–5 h after peak plasma levels. In contrast, the highest excretion of monomethylxanthines delayed 10–12 h with respect to peak plasma concentrations. Interestingly, when a different cocoa product providing a lower amount of CF (10 mg) was consumed, the highest elimination of CF and its metabolites took place between 12 and 18 h after reaching maximum plasma levels (Martínez-López et al., 2014), pointing to the importance of dosage on the metabolism and clearance of CF. It has been shown that high CF concentrations change the participation of CYP isoforms in the metabolism of this methylxanthine (Arnaud, 2011). None of the CF metabolites detected in urine returned to basal levels after 24 h, clearly showing slow metabolism and prolonged elimination (Fig. 4).

Of the total amount of metabolites excreted in urine during the intervention, 86.2% of the metabolites were mainly originated from the PX pathway, amounting to 1-MU, 1-MX, PX, and 7-MX elimination of 67.7%, 8.8%, 5.5% and 4.2% of the total metabolites, respectively. Unmetabolized CF represented about 2.7% of the total amount of urinary metabolites, which is in agreement with other studies that described an incomplete CF biotransformation in humans (Bonati et al., 1982; Rodopoulos et al., 1995).

4. Conclusions

In summary, this work presents for the first time information on the pharmacokinetics of up to 11 methylxanthine metabolites in plasma and urine after consuming a single, realistic dose of a green/roasted coffee product (3.5 g) providing 70.7 mg of caffeine. HPLC-DAD allows simultaneous analysis of caffeine and its major metabolites in biological fluids with minimum sample preparation. Caffeine is rapidly absorbed and primarily metabolized by the paraxanthine pathway, leading to the formation of PX as the major metabolite in plasma together with 1-MX and 1-MU, described in plasma for the first time. High urinary excretion of methylated xanthines and uric acids, mainly 1-MU as the major CF metabolite in urine, takes place within 24 h after coffee consumption, confirming the fast metabolism of caffeine in humans.

Acknowledgments

We are grateful to the volunteers participating in the study, as well as to the Analysis Service Unit (USTA) facilities of ICTAN for the analysis of mass spectrometry, and to Laura Barrios for statistical assistance. Nestlé S. A. is acknowledged for kindly providing the coffee products. This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2010-18269 and Consolider-Ingenio CSD2007-00063). S.M.-L. is a predoctoral fellow of the JAE Program (JAEPre-097) funded by CSIC and the European Social Fund. G. B. is a FPI (BES-2011-047476) fellow funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation. L.B. conceived and designed the study. All the authors revised and approved the final version of the manuscript. The authors declare no conflicts of interest.

References

- Alonso-Salces, R. M., Guillou, C., & Berrueta, L. A. (2009). Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionization, collision induced dissociation and tandem mass spectrometry on a triple quadrupole for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 363–383.

- Alvi, S. N., & Hammami, M. M. (2011). Validated HPLC method for determination of caffeine level in human plasma using synthetic plasma: Application to bioavailability studies. *Journal of Chromatographic Science*, 79, 292–296.
- Aragao, N. M., Veloso, M. C. C., Bispo, M. S., Ferreira, S. L. C., & de Andrade, J. B. (2005). Multivariate optimization of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 67, 1007–1013.
- Arnaud, M. J. (2011). Pharmacokinetic and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 200, 33–91.
- Atia, N., York, P., & Clark, B. J. (2009). Development and validation of a rapid and efficient method for simultaneous determination of methylxanthines and their metabolites in urine using monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*, 32, 931–938.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., & Hadi, S. M. (2003). Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 9, 325–330.
- Blanchard, J., & Sawers, S. J. (1983). The absolute bioavailability of caffeine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 24, 93–98.
- Bonati, M., Latini, R., Galletti, F., Young, J. F., Tognoni, G., & Garattini, S. (1982). Caffeine disposition after oral doses. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 32, 98–106.
- Bonita, J. S., Mandarano, M., Shuta, D., & Vinson, J. (2007). Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, 55, 187–198.
- Bravo, L., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Martínez-López, S., & Mateos, R. (2010). Posibles beneficios del consumo de café verde en salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 17, 79–87.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of the dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 135–141.
- Chu, Y. F., Brown, P. H., Lyle, B. J., Chen, Y., Black, R. M., Williams, C. E., et al. (2009). Roasted coffee high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9801–9808.
- Crozier, T. W. M., Stalmach, A., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2011). Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: Potential health implications. *Food & Function*, 3, 30–33.
- Frost-Meyer, N. J., & Logomarsino, J. V. (2012). Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods*, 4, 819–830.
- Georga, K. A., Samanidou, V. F., & Papadopoulos, I. N. (2001). Use of novel solid-phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin. *Journal of Chromatography B*, 759, 209–218.
- Gómez-Ruiz, J. A., Leake, D. S., & Ames, J. M. (2007). In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6962–6969.
- Haskell, C. F., Kennedy, D. O., Wesnes, K. A., & Scholey, A. B. (2005). Cognitive and mood improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology*, 179, 813–825.
- Kaplan, G. B., Greenblatt, D. J., Ehrenberg, B. L., Goddard, J. E., Cotreau, M. M., Harmatz, J. S., et al. (1997). Dose-dependent pharmacokinetics and psychomotor effects of caffeine in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*, 37, 693–703.
- Kemp, K., Herder, C., Erlund, I., Kolb, H., Martin, S., Carstensen, M., et al. (2010). Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: A clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 950–957.
- Koleva, I. I., van Beek, T. A., Soffers, A. E. M. F., Dusemund, B., & Rietjens, I. M. C. M. (2012). Alkaloids in the human food chain – Natural occurrence and possible adverse effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 30–52.
- Kot, M., & Daniel, W. A. (2008). Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacological Reports*, 69, 789–797.
- Kuwazawa, T., Seno, H., Lee, X.-P., Akiro, I., Watanabe-Suzuki, K., Sato, K., et al. (1999). Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 387, 53–60.
- Lang, R., Dieminger, N., Beusch, A., Lee, Y., Dunkel, A., Sues, B., et al. (2013). Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 8487–8503.
- Leakey, T. E. B. (1990). Simultaneous analysis of theophylline, caffeine and eight of their metabolic products in human plasma by gradient high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 507, 199–220.
- Lelo, A., Miners, J. O., Robson, R., & Birkett, D. J. (1986). Assessment of caffeine exposure: Caffeine content of beverages, caffeine intake, and plasma concentrations of methylxanthines. *Clinical & Pharmacologic Therapy*, 39, 54–59.
- Martin, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Granado, A. B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., et al. (2008). Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7765–7772.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Goya, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.2009>.
- Monteiro, M., Farah, A., Perrone, D., Trugo, L. C., & Donangelo, C. (2007). Chlorogenic acid compounds from coffee are differently absorbed and metabolized in humans. *The Journal of Nutrition*, 137, 2196–2201.
- Mostofsky, E., Rice, M., Levitan, E. B., & Mittleman, M. A. (2012). Habitual coffee consumption and risk of heart failure: A dose-response meta-analysis. *Circulation. Heart Failure*, 5, e99.
- Mumford, G. K., Benowitz, N. L., Evans, S. M., Kaminski, B. J., Preston, K. L., Sannerud, C. A., et al. (1996). Absorption rate of methylxanthines following capsules, cola and chocolate. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 51, 319–325.
- Neufingerl, N., Zebregs, Y. E. M. P., Schuring, E. A. H., & Trautwein, E. A. (2013). Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: A randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 1201–1209.
- Perera, V., Gross, A. S., & McLachlan, A. J. (2010). Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomedical Chromatography*, 24, 1136–1144.
- Perera, V., Gross, A. S., Xua, H., & McLachlan, A. J. (2011). Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 1161–1168.
- Renouf, M., Marmet, C., Guiffida, F., Lepage, M., Barron, D., Beaumont, M., et al. (2014). Dose-response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58, 301–309.
- Riksen, N. P., Smits, P., & Rongen G. A. (2011). The cardiovascular effects of methylxanthines. In: Fredholm BB, ed. *Methylxanthines*. Heidelberg, Germany: Springer Verlag Berlin, 413–437.
- Rodopoulos, N., & Norman, A. (1996). Assessment of dimethylxanthine formation from caffeine in healthy adults: Comparison between plasma and saliva concentrations and urinary excretion of metabolites. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 56, 259–268.
- Rodopoulos, N., Wisen, O., & Norman, A. (1995). Caffeine metabolites in patients with chronic liver disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 55, 229–242.
- Samanidou, V., Tsagiannidis, A., & Sarakatsianos, I. (2012). Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek *Sideritis* species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Separation Science*, 35, 608–615.
- Schneider, H., Ma, L., & Glatt, H. (2003). Extractionless method for the determination of urinary caffeine metabolites using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 789, 227–237.
- Schreiber-Deturmeny, E., & Bruguerolle, B. (1996). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of caffeine and theophylline for routine drug monitoring in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 677, 305–312.
- Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, D., Yokota, T., Cavin, C., et al. (2009). Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: Identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metabolism and Disposition*, 37, 1749–1758.
- Suh, S.-Y., Choi, Y. S., Oh, S. C., Kim, Y. S., Cho, K., Bae, W. K., et al. (2013). Caffeine as an adjuvant therapy to opioids in cancer pain: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Pain and Symptom Management*, 46, 474–482.
- Teekachunhatean, S., Tosri, N., Rojanasthien, N., Srichairatanakool, S., & Sangdee, C. (2013). Pharmacokinetics of caffeine following a single administration of coffee enema versus oral coffee consumption in healthy male subjects. *ISRN Pharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/147238>.
- Usansky, J. I., Desai, A., & Tang-Liu, D. (2011). *PK functions for Microsoft Excel*. Irvine, CA: Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan.
- Weedick, N. M., Brennan, A. M., Sun, Q., Hu, F. B., Mantzoros, C. S., & van Damm, R. M. (2011). Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 10, 93–101.
- Zydron, M., Baranowski, J., & Baranowska, I. (2004). Separation, pre-concentration, and HPLC analysis of methylxanthines in urine samples. *Journal of Separation Science*, 27, 1166–1172.

**EFFECTOS EN SALUD DE
PRODUCTOS SOLUBLES DE
CACAO**

Resumen

El objetivo general de la investigación recogida en este capítulo fue la evaluación de los posibles efectos en salud cardiovascular del consumo regular en dosis realistas de dos productos solubles de cacao enriquecidos en distintos ingredientes funcionales, correspondiente con el siguiente objetivo específico:

Objetivo 2.- Valoración del potencial efecto en función cardiovascular de dos productos solubles de cacao ricos en fibra dietética y en compuestos polifenólicos en sujetos sanos e hipercolesterolémicos.

Metodología

Se llevó a cabo un estudio de intervención crónica cruzado, controlado, aleatorizado durante las dos primeras etapas del estudio, en 44 adultos sanos y con riesgo cardiovascular (hipercolesterolémicos). Tras una etapa basal de adaptación (dieta restrictiva de alimentos ricos en polifenoles), los voluntarios se dividieron aleatoriamente, tomando dos veces al día el producto de cacao rico en fibra dietética (CC-FD, 30 g/día) disuelto en leche o sólo leche semidesnatada (control) durante 4 semanas. Siguió una etapa de lavado de 2 semanas, tras la que se cruzó el consumo de leche o CC-FD durante 4 semanas. Tras un nuevo lavado de 2 semanas, los voluntarios consumieron durante 4 semanas el producto de cacao rico en polifenoles (CC-PF, 15 g/día).

Al final de cada etapa, se tomaron muestras de sangre en ayunas y orina, se monitorizó presión arterial y frecuencia cardíaca, y se realizó un estudio antropométrico. Se controló la ingesta dietética y la actividad física mediante registros dietéticos y cuestionarios en distintos momentos a lo largo del estudio.

En las muestras sanguíneas se determinaron parámetros bioquímicos y hematológicos básicos, perfil lipídico, capacidad antioxidante (ORAC, FRAP, ABTS), marcadores de oxidación a proteínas (grupos carbonilo) y lípidos (MDA) y diferentes marcadores de inflamación y función vascular: citoquinas pro- y anti-inflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1, moléculas de adhesión sICAM-1 y sVCAM-1.

Resultados

Tanto los voluntarios sanos como los hipercolesterolémicos incrementaron la ingesta de polifenoles tras el consumo de ambos productos solubles de cacao. De la misma forma, la ingesta de FD incrementó significativamente en las dos intervenciones con cacao, siendo este efecto mayor con el producto CC-FD.

La ingesta de ninguno de los dos productos de cacao tuvo un efecto significativo sobre la presión arterial ni sobre el poder antioxidante en suero. Sin embargo, ambos cacaos incrementaron significativamente los niveles séricos de HDL-C en ambos grupos de intervención (sujetos sanos e hipercolesterolémicos) con respecto a la situación basal, sin afectar los niveles de colesterol total ni de LDL-C.

Se observó un menor índice de inflamación en ambos grupos de intervención tras el consumo de los dos productos solubles de cacao, con la reducción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8, TNF- α) y moléculas de adhesión (sICAM-1 y sVCAM-1), aunque sin llegar a alcanzar el nivel de significancia. Sí fue estadísticamente significativo el descenso en los niveles de IL-10 como consecuencia del consumo de los dos productos de cacao, así como la disminución en los niveles de IL-1 β tras la intervención con cacao CC-FD que también redujo significativamente los niveles de glucosa en sangre.

Conclusiones

La ingesta regular de alimentos conteniendo fibra dietética y polifenoles entre sus ingredientes bioactivos parece mejorar las funciones fisiológicas implicadas en el sistema vascular. Así, cuando cacao enriquecido en estos ingredientes funcionales se consume de forma regular y en cantidades moderadas dentro de una dieta equilibrada resulta ser beneficioso para la salud cardiovascular.

Objetivo 2.- Valoración del potencial efecto en función cardiovascular de productos solubles de cacao ricos en fibra dietética y en compuestos polifenólicos en sujetos sanos e hipercolesterolémicos.

Artículo 3.

Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolemic adults.

Beatriz Sarriá, Sara Martínez-López, José Luis Sierra-Cinos, Luis García-Diz, Raquel Mateos, Laura Bravo

British Journal of Nutrition (2014), 111, 122-134 (doi: 10.1017/S000711451300202X)



Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults

Beatriz Sarriá^{1*†}, Sara Martínez-López^{1†}, José Luis Sierra-Cinos², Luis García-Diz², Raquel Mateos¹ and Laura Bravo¹

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid, Spain

²Department of Nutrition and Bromatology I, Pharmacy Faculty, Complutense University of Madrid (UCM), Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

(Submitted 15 January 2013 – Final revision received 8 May 2013 – Accepted 27 May 2013 – First published online 4 July 2013)

Abstract

Cocoa products present great health potential due to their high content of polyphenols, mainly of flavanols. However, the antioxidant, anti-inflammatory and other health effects of regularly consuming cocoa products seem to depend on the intake and health status of the consumer, etc. and need to be further clarified. A randomised, controlled, cross-over, free-living study was carried out in healthy (n 24) and moderately hypercholesterolaemic (>2000 mg/l, n 20) subjects to assess the influence of regularly consuming (4 weeks) two servings (15 g each) of a cocoa product rich in fibre (containing 33.9% of total dietary fibre (TDF) and 13.9 mg/g of soluble polyphenols) in milk *v.* consuming only milk (control) on (1) serum lipid and lipoprotein profile, (2) serum malondialdehyde levels, carbonyl groups, ferric reducing/antioxidant power, oxygen radical absorbance capacity and free radical-scavenging capacity, (3) IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and vascular and intracellular cell adhesion molecule levels, and (4) systolic and diastolic blood pressure and heart rate. Throughout the study, the diet and physical activity of the volunteers, as well as any possible changes in weight or other anthropometric parameters, were also evaluated. The intake of TDF increased ($P<0.001$) to the recommended levels. Serum HDL-cholesterol (HDL-C) levels were increased ($P<0.001$), whereas glucose ($P=0.029$), IL-1 β ($P=0.001$) and IL-10 ($P=0.001$) levels were decreased. The rest of the studied cardiovascular parameters, as well as the anthropometric ones, remained similar. In conclusion, regularly consuming a cocoa product with milk improves cardiovascular health by increasing HDL-C levels and inducing hypoglycaemic and anti-inflammatory effects in healthy and hypercholesterolaemic individuals without causing weight gain.

Key words: Dietary fibre: Cocoa polyphenols: HDL-cholesterol: Cytokines: Adhesion molecules: Antioxidants: Inflammation

The potential health-promoting effects of cocoa products have gained extensive attention in the last few years. Most of these effects are attributed to the polyphenolic fraction of cocoa, especially to the flavonoid group of polyphenols, which in cocoa are mainly flavanols. In fact, cocoa has been defined as a functional food due to its high flavanol content⁽¹⁾. Moreover, soluble cocoa products are also a source of dietary fibre (DF). Cocoa powder contains 1.75% of DF, whereas in chocolate production DF is largely discarded⁽²⁾. Nowadays, new soluble cocoa products enriched with dietary components such as DF and polyphenols are being introduced

into the food market, and their beneficial health properties need to be assessed.

The cardio-protective properties of cocoa products in humans have been mainly attributed to their polyphenol content. Cocoa flavanols may decrease LDL oxidation, improve plasma antioxidant status, increase the levels of HDL-cholesterol (HDL-C), decrease the levels of biomarkers of lipid oxidation and improve endothelial function by increasing vascular NO synthase activity; the effect of NO synthase has been observed in studies using endothelial cells and in isolated rabbit aortic rings⁽³⁾. Cocoa flavanols have been

Abbreviations: C + M, cocoa + milk intervention stage; CRP, C-reactive protein; DF, dietary fibre; HDL-C, HDL-cholesterol; ICAM-1, intracellular cell adhesion molecule 1; IDF, insoluble dietary fibre; M, milk intervention stage; MDA, malondialdehyde; NS, neutral sugars; SDF, soluble dietary fibre; SEQC, Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; TDF, total dietary fibre; UA, uronic acids; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1.

*Corresponding author: B. Sarriá, fax +34 915493627, email beasarria@ictan.csic.es

† Both authors contributed equally to this work.



the subject of health claims: maintenance of normal blood pressure and protection of lipids from oxidative damage⁽⁴⁾. The European Food Safety Authority has recently⁽⁵⁾ issued a positive opinion on cocoa flavanols and maintenance of flow-mediated vasodilation, which evaluates the capacity of conduit artery, typically the brachial artery, to respond to an increase in blood flow by dilating, as consistent acute and chronic benefits of chocolate or cocoa on flow-mediated vasodilation have been described regardless of the dose consumed^(6,7). Ried *et al.*⁽⁸⁾ concluded in their review that flavanol-rich chocolate and cocoa products may have a small but statistically significant effect in lowering blood pressure by 2–3 mmHg in the short term. However, in 2010, the European Food Safety Authority⁽⁴⁾ Panel concluded that a cause-and-effect relationship could not be established between the consumption of cocoa flavanols and protection of lipids from oxidative damage based on the review by Ding *et al.*⁽⁹⁾. In the review, two long-term studies have reported no effects on F₂-isoprostanes^(10,11) and another has reported that plasma oxidised LDL concentrations were decreased in the low-, middle- and high-cocoa groups compared with baseline; however, changes between the intervention groups and the placebo group were not assessed⁽¹²⁾. Therefore, the antioxidant effects of regularly consuming cocoa products need further clarification. Recently, it has been shown that polyphenols contained in the water-insoluble cocoa fraction exhibit antioxidant actions in the gastrointestinal tract despite being bound to macromolecules using an *in vitro* digestion model⁽¹³⁾. In acute studies, it has been shown that the consumption of a single dose of dark chocolate (40 g of 74% cocoa) markedly improves endothelium-mediated flow-mediated vasodilation and plasma antioxidant status in young healthy smokers⁽¹⁴⁾ and that the intake of flavonoid-rich dark chocolate (40 g) compared with that of cocoa-free control chocolate reduces plasma isoprostane levels in cardiac transplant recipients⁽¹⁵⁾.

Furthermore, the natural content of cocoa in DF⁽¹⁶⁾ may contribute to the beneficial cardiovascular effects, as it has been proposed that a protective effect of DF against CVD is mediated through direct or indirect effects on serum lipids, possibly through the up-regulation of HDL-C levels^(17,18). Although the health benefits of DF have been mainly attributed to soluble dietary fibre (SDF), insoluble dietary fibre (IDF) through the dilution of gastrointestinal contents may hinder the digestion and absorption of dietary fats⁽¹⁹⁾. In fact, our group observed that a cocoa product rich in IDF induced slight hypocholesterolaemic and marked hypotriacylglycerolaemic effects, also reducing malondialdehyde (MDA) levels in serum and in the liver of hyperlipidaemic rats without inducing changes in serum total antioxidant capacity⁽¹⁹⁾. When the same fibre-rich cocoa product was regularly consumed as part of a non-restrictive, Mediterranean-Spanish diet, blood pressure and serum glucose and MDA levels were decreased in moderately hypercholesterolaemic subjects, without affecting body weight⁽²⁰⁾. Taking these beneficial cardiovascular results into account, a new cocoa product rich in insoluble fibre has been developed and the effects of

its regular consumption on cardiovascular risk factors have been assessed in human subjects.

The influence of cocoa on inflammatory parameters seems to depend on the amount of cocoa consumed and the health status of the consumer. Regular consumption of one serving of dark chocolate for 3 d significantly decreases the low-grade inflammation biomarker C-reactive protein (CRP) levels, whereas with higher intakes this effect is not maintained⁽²¹⁾. Hypercholesterolaemic postmenopausal women who consumed a high-flavanol cocoa beverage for 6 weeks had significantly lower levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) than those who consumed a low-flavanol cocoa beverage⁽²²⁾. In contrast, the consumption of moderate amounts of cocoa-related products induced platelet-inhibiting effects, although the levels of inflammation biomarkers did not change⁽²³⁾. DF has also been reported to exert anti-inflammatory effects. In postmenopausal women, a greater intake of total, soluble and insoluble DF was inversely associated with IL-6 and TNF- α receptor 2 (TNF- α -R2) levels in plasma, but not with CRP levels⁽²⁴⁾. In contrast, in women with type 2 diabetes, the highest intake of whole grains was associated with both lower CRP and TNF- α levels compared with the lowest intake of whole grains⁽²⁵⁾.

In conclusion, intermediate and long, well-controlled, human studies that evaluate the effects of realistic, moderate consumption of cocoa products on cardiovascular health are necessary. Bearing this in mind, we conducted a study in healthy and hypercholesterolaemic subjects to examine the influence of regularly consuming for 4 weeks a commercially available cocoa product rich in fibre in milk *v.* consuming only milk (control) on a broad range of cardiovascular biomarkers: serum lipid and lipoprotein levels; serum oxidation and antioxidant biomarker levels; plasma inflammation biomarker levels; blood pressure; heart rate. As cocoa products are relatively high-energy foods, their addition to a diet may lead to weight gain, which is an undesirable confounding factor that may affect the studied parameters; therefore, a wide range of anthropometric parameters were controlled, as well as physical activity, which is a well-known protective factor against the occurrence and progression of CVD.

Experimental methods

Subjects

The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda in Madrid (Spain). Written informed consent was obtained from all subjects. Volunteer recruitment was carried out by placing advertisements in the Universidad Complutense campus as well as by giving short talks between lectures. The inclusion criteria were as follows: having total cholesterol concentrations < 2000 and > 2000 mg/l for the normocholesterolaemic and hypercholesterolaemic groups, respectively; being non-vegetarian and non-smoker for both men and women and being non-pregnant for women; aged between



18 and 55 years; not suffering from any chronic pathology or gastrointestinal disorder. None of the subjects had taken dietary supplements, laxatives or antibiotics 6 months before the start of the study. Their BMI was less than 30 kg/m².

On the whole, fifty subjects initially accepted to participate in the study and gave informed written consent; however, only forty-four completed it.

Study design

This was a randomised, controlled, cross-over, free-living study. After a 2-week run-in stage, in which consumption of the fruit, vegetables and beverages mentioned below was restricted, the subjects consumed two sachets of soluble cocoa powder per d, one for breakfast and the other as a snack between lunch and dinner (in order to reduce interferences with other food items) in 200 ml of semi-skimmed milk (total intake: 400 ml/d in the cocoa + milk (C + M) intervention stage) or two 200 ml servings of semi-skimmed milk for 4 weeks (400 ml/d in the milk (M) intervention stage) in a random order. Blood samples and blood pressure, heart rate and anthropometric measurements were taken at baseline and at the end of each intervention. The trial was conducted during autumn months. The soluble cocoa product was provided by Nutrexpa S.L. It contained 33.9% of total dietary fibre (TDF) and 13.88 mg/g of soluble polyphenols; therefore, the two servings of cocoa provided 10.17 g/d of TDF and 416.4 mg/d of polyphenols. The servings used (15 g/sachet) in the present study corresponded to the quantity of the product that can reasonably be expected to be consumed. During the run-in stage and the intervention periods, consumption of other cocoa products, oranges, mandarins, apples, grapes, strawberries, berries in general, beets and onion, as well as their derived beverages, including wine and juices, and tea was restricted in order to reduce inter-individual differences in the intakes of DF and polyphenols.

Dietary control and compliance

The subjects were asked to maintain the same dietary habits throughout the study. Their dietary intake was regularly evaluated to control any possible changes. The volunteers were instructed on how to fill the dietary records before starting the study. In the run-in stage and at the end of the two intervention periods, the volunteers were asked to complete a 72 h detailed food intake report, specifying the ingredients and amounts of food consumed, including serving weights (when possible) and household measurements. Compliance was controlled by counting the number of cocoa servings provided to the volunteers before and after the interventions, as well as by weekly calling the volunteers. In order to assess energy intake and dietary composition, the programme DIAL (Department of Nutrition and Bromatology I, Pharmacy Faculty, Complutense University of Madrid (UCM), Spain) was used. The intake of polyphenols was estimated using the program www.phenol-explorer.eu taking into account the Folin–Ciocalteu method.

Cocoa fibre and polyphenol analysis

The TDF of the cocoa product was analysed in triplicate defatted samples following the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) method modified in our laboratory⁽²⁶⁾. Briefly, the cocoa samples were treated with heat-stable α -amylase (A-3306; Sigma), protease (P-3910) and amyloglucosidase (A-9913), followed by centrifugation (15 min, 3000 g) instead of filtration to separate the soluble and insoluble fractions obtained after the enzymatic hydrolysis of digestible compounds. Supernatants were quantitatively collected and pellets were washed twice with 10 ml of distilled water and centrifuged, and all the supernatants were combined. These were transferred into dialysis tubes (12 000–14 000 molecular weight cut-off (MWCO), Dialysis Tubing Visking; Medicell International Limited) and dialysed against water for 48 h at 25°C (water flow 7 litres/h in a 43-litre reservoir). Dialysates (SDF) were hydrolysed with 1 M-H₂SO₄ at 100°C for 90 min and NSP was determined in the hydrolysates. The residues obtained after enzymatic hydrolysis of the samples (IDF) were dried overnight at room temperature and hydrolysed with 12 M-H₂SO₄ for 1 h at 30°C and then diluted with 1 M-H₂SO₄ at 100°C for 90 min with shaking. After acid hydrolysis, the samples were centrifuged (15 min, 3000 g), pellets were washed twice with distilled water, and the combined supernatants were collected for the determination of NSP. The residues were dried at 105°C overnight and gravimetrically quantified as Klason lignin.

Uronic acids (UA) in the hydrolysates from both SDF and IDF were quantified spectrophotometrically by the Scott⁽²⁷⁾ method using galacturonic acid as a standard. Neutral sugars (NS) were analysed by spectrophotometry following the Southgate method⁽²⁸⁾. TDF was calculated as IDF + SDF; IDF was calculated as NSP + Klason lignin and SDF as NSP (NSP = UA + NS). Polyphenols were extracted following a procedure set up by our group⁽²⁹⁾ and were analysed spectrophotometrically as total polyphenols using the Folin–Ciocalteu reagent and gallic acid as a standard, and the extracts were characterised by HPLC-diode array detection (DAD) using an Agilent 1200 series liquid chromatograph⁽³⁰⁾.

Blood samples

Blood samples were drawn after an overnight fasting for 8–10 h at baseline and after the consumption of milk or milk + cocoa for 4 weeks. Serum (without an anticoagulant) and plasma (EDTA-coated tubes) were separated by centrifugation and frozen at –80°C until analysis.

Biochemical parameters

The lipid profile of the serum samples was determined following reference methods or methods recommended by Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) using the Roche Cobas Integra 400 plus analyser (Roche Diagnostics). The concentrations of uric acid, creatinine and glucose were determined according to standardised spectrophotometric techniques, and the concentration of CRP was determined using an automatised ultrasensitive



turbidimetric method (AU2700 Biochemistry analyser; Olympus). Reference ranges used for all the biochemical parameters were those indicated by SEQC.

Inflammation biomarkers

The concentrations of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-8 in the plasma samples were determined using the High Sensitivity Human Cytokine MILLIPLEX MAP kit (Millipore Corporation), and those of monocyte chemoattractant protein-1, VCAM-1 and intracellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1) were determined using the Human Cardiovascular disease MILLIPLEX MAP kit on a Luminex equipment (Luminex-100/200; Luminex Corporation). High- and low-concentration quality controls were used with all the biomarkers.

Oxidation and antioxidant biomarkers

The concentration of MDA was determined as that of its hydrazone by HPLC using dinitrophenylhydrazine for derivatisation⁽³¹⁾. Serum samples were analysed directly, and standard MDA was prepared by acidic hydrolysis of 1,1,3,3-tetraethoxypropane in 1% sulphuric acid. The concentrations are expressed as nmol MDA/mm in serum. Protein oxidation of the serum samples was measured as carbonyl group content according to the method of Richert *et al.*⁽³²⁾. Absorbance was measured at 360 nm, and carbonyl content is expressed as nmol/mg protein using an extinction coefficient of 22 000 nmol/l per cm. Protein content of the serum samples was determined using the Bradford reagent.

The antioxidant capacity of the fibre-rich cocoa powder was evaluated in the soluble polyphenol extract and serum samples using the ferric reducing/antioxidant power assay⁽³³⁾. Free radical-scavenging capacity of the cocoa product and serum samples was also measured using the radical monocation 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) discolouration method⁽³⁴⁾ with some modifications. The oxygen radical absorbance capacity of the serum samples was determined according to the method of Huang *et al.*⁽³⁵⁾. For the three parameters, Trolox was used as a standard, and results are expressed as μ mol of Trolox equivalents/g DM of the product and per ml of serum.

Blood pressure parameters

Blood pressure and heart rate were measured using an automatic arm sphygmomanometer (BS 150; Pic Indolor Diagnostic). At baseline and after 4 weeks, the volunteers were asked to rest on a chair before the cuff was placed on their left arm. After they were rested for 5 min, a second reading was taken on the same arm. Readings were compared, and if not in agreement within 10–15 mmHg, a third reading was taken.

Anthropometric measurements

At baseline and the two intervention periods, the total body and trunk fat percentage of the volunteers was assessed from tetrapolar bioimpedance measurements using a Tanita

segmental body composition analyser BC-418 MA (Tanita Corporation). The device had a weighing system, which was used to weigh the volunteers, and their height was determined using a Holtain precision mechanical stadiometer (Holtain Limited). With these data, BMI was calculated according to the following formula: weight (kg)/height (m)². Brachial, waist, abdominal, hip and thigh circumferences were measured using a SECA 203 flexible tape (SECA UK Ltd) (Table 6). Tricipital and subscapular skin folds were measured using an anthropometric calliper (Harpender Anthropometer; Holtain Limited). By means of these biometry data, body density⁽³⁶⁾ and the percentage of body fat⁽³⁷⁾ were calculated.

Physical activity

The participants were asked to maintain their usual level of physical activity during the study. The volunteers filled out a questionnaire before the start of the study to report on their occupation and consequently the level of physical activity involved. At the beginning and end of the study, physical activity levels were calculated using an adapted version of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire by Martínez-González *et al.*⁽³⁸⁾. Total energy expenditure from leisure time was obtained by making the assumption that one metabolic equivalent is approximately 4.2 kJ/min (1 kcal/min) for a 70 kg man. Taking this into account and knowing the duration that the activities were performed per day, the data are expressed as kJ/d.

Statistical analysis

Taking total cholesterol as the main variable, a sample size of twenty-three subjects per group was calculated in order to obtain a statistical power of 80% such that the study will detect a treatment difference at the 0.05 significance level, if the true difference between the treatments is 60 mg/l. This is based on the assumption that the within-patient standard deviation of the response variable is 10.

Data are presented as means with their standard errors, unless specified otherwise. Before the statistical analysis, the normality of distribution and the homogeneity of variance were verified using the Kolmogorov–Smirnov and Levene tests, respectively. The general linear model of variance for repeated measures was used to assess differences in all the parameters studied in response to the interventions. To exclude the carry-over effect for the two periods, we compared the differences in the parameters obtained from the group that started with the C + M intervention with those in the parameters obtained from the group that started with the M intervention. In order to assess the effects of belonging to the normocholesterolaemic or hypercholesterolaemic group, the group was considered as an inter-individual factor. Differences within either the normocholesterolaemic or hypercholesterolaemic group were studied using the Bonferroni test. Statistical significance was set at $P < 0.05$. The statistical analysis was carried out using the SPSS statistical package (version 19.0; SPSS, Inc., IBM Company) and Statgraphics Centurion XVII (Stat Point Technologies, Inc.).



Results

Cocoa product fibre and polyphenol analysis

The percentage of TDF and the content of the major constituents of the SDF and IDF fractions (NS, UA and Klason lignin) in the studied cocoa product were as follows: the percentage of the SDF fraction, which accounted for approximately 5% of the TDF, was 1.68 (SEM 0.10) % DM, being formed by NS (0.69 (SEM 0.04) % DM) and UA (0.99 (SEM 0.09) % DM). Quantitatively, IDF was the main DF component of cocoa, accounting for 95% of TDF. Close to 60% of the IDF fraction corresponded to NSP, which was made of NS (19.06 (SEM 1.60) % DM) and UA (1.26 (SEM 0.07) % DM), with the remaining being Klason lignin (11.90 (SEM 0.28) % DM). Soluble polyphenols in cocoa analysed spectrophotometrically were 13.88 (SEM 0.24) mg/g DM and attending to HPLC-DAD analysis (n 6) cocoa contained 1.47 (SEM 0.2) mg/g DM of total flavanols, 0.31 (SEM 0.08) mg/g DM of epicatechin, 0.60 (SEM 0.11) mg/g DM of catechin and 0.55 (SEM 0.04) mg/g DM of procyanidin B2.

Subjects

Of the fifty volunteers who were enrolled into the study, six withdrew due to personal, health or professional reasons. Of the remaining forty-four volunteers, twenty-four were women with an average age of 25.75 (SD 6.29) years and a BMI of 22.2 (SD 2.42) kg/m², and twenty were men with an average age of 32 (SD 10.04) years and a BMI of 25.15 (SD 3.94) kg/m². The baseline characteristics of the forty-four subjects who completed the study are given in Table 1 and are separated into normocholesterolaemic (n 24) and moderately hypercholesterolaemic (n 20).

Dietary control and compliance

Based on the reports of the volunteers and the number of servings returned after the interventions, dietary compliance was high. The 72 h intake reports were pre-filtered to exclude those that were not reliable. We considered reports unreliable if estimations of daily energy intake were 70% below the light-activity energy intake recommendations or 130% above the normal-activity energy intake recommendations for age and

sex group⁽³⁹⁾, as well as unjustified differences of over 4184 kJ (1000 kcal) between the baseline and final reports. The 72 h detailed food intake reports (Table 2) showed that DF ($P < 0.001$) and protein ($P < 0.001$) intakes were statistically higher after the C + M intervention stage than after the other stage. In contrast, the intakes of energy, polyphenols, carbohydrates, lipids, cholesterol and fatty acids (monosaturated, polysaturated and saturated) increased without reaching the level of statistical significance. For all the indicated parameters, both the groups exhibited the same behaviour after the consumption of cocoa, and no significant cocoa \times group interaction was observed.

Biochemical parameters

Biochemical results are given in Table 3. After the interventions, total cholesterol, LDL-cholesterol and TAG levels did not show statistically significant differences; in contrast, HDL-C levels were significantly increased ($P < 0.001$). The concentrations of glucose ($P = 0.029$) and creatinine ($P = 0.005$) were significantly decreased. Alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase enzyme levels were significantly increased ($P = 0.001$ and 0.001 , respectively), although both the parameters remained within their respective SEQC reference ranges of normality (0–41 and 0–38 U/l). The levels of urea were significantly increased ($P = 0.001$) in contrast to those of creatinine, which were decreased ($P = 0.005$) after the cocoa intervention, with both the parameters remaining within their respective SEQC reference ranges (100–500 and 5.0–13.0 mg/l).

Inflammatory and adhesion molecule biomarkers

The values of inflammatory and adhesion molecule levels showed a high variability (Table 4). The values of IL-1 β , IL-6 and IL-8 levels observed were within the normal physiological range described by Kokkonen *et al.*⁽⁴⁰⁾, whereas those of IL-10 levels were above the corresponding reference range (2.4–6.6 pg/ml) and those of TNF- α levels were below the reference range (14.2–61.7 pg/ml). The values of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α levels were slightly decreased at the end of the intervention, particularly in the hypercholesterolaemic group, without reaching the level of statistical significance,

Table 1. Baseline characteristics of the participants in the study (Mean values and standard deviations)

	Normocholesterolaemic (n 24)				Hypercholesterolaemic (n 20)			
	Men (n 11)		Women (n 13)		Men (n 9)		Women (n 11)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Age (years)	28.1	7.9	26.1	6.1	35.7	11.2	25.4	6.8
Weight (kg)	75.2	10.6	60.3	7.7	81.0	14.9	58.8	5.5
BMI (kg/m ²)	24.1	3.6	22.0	2.6	26.2	4.2	22.4	2.3
Systolic BP (mmHg)	117	10.2	115	9.1	122	15.3	118	10.4
Diastolic BP (mmHg)	71.8	8.0	72.8	8.4	79.8	10.3	73.9	8.4
Heart rate (bpm)	65.1	10.1	69.1	9.8	63.8	9.5	82.2	8.2

BP, blood pressure; bpm, beats per min.



Table 2. Reported energy and dietary component intakes*
(Mean values with their standard errors)

	Normocholesterolaemic (n 24)						Hypercholesterolaemic (n 20)						C × group
	Baseline			M intervention			C + M intervention			Baseline			C
	Mean	SEM		Mean	SEM		Mean	SEM		Mean	SEM		P†
Energy (kcal/d)	2344	113		2321	117		2560	136		2502	149		NS
Energy (kJ/d)	9807	473		9711	490		10795	569		10468	623		NS
Dietary fibre (g/d)	17.8 ^a	0.97		17.0 ^a	0.91		23.9 ^b	1.29		18.5 ^a	2.02		NS
Polyphenols (mg/d)	1406	198		1333	189		1549	154		1518	222		NS
Carbohydrates (g/d)	220	9.88		209	12.3		240	9.96		229	22.4		NS
Lipids (g/d)	104	7.32		104	7.14		107	8.51		111	7.57		NS
Proteins (g/d)	96.6 ^a	7.05		99.2 ^a	6.01		122 ^b	7.84		100 ^a	4.92		NS
Cholesterol (mg/d)	376	31.4		365	26.1		411	33.1		413	34.6		NS
MUFA (g/d)	49.6	3.9		47.9	3.94		48.4	4.10		52.3	3.88		NS
PUFA (g/d)	13.2	1.11		13.9	1.68		13.9	1.61		16.24	1.42		NS
SFA (g/d)	33.9	2.46		34.2	2.05		34.8	2.76		39.2	3.27		NS

M, milk; C + M, cocoa + milk; C, cocoa.
^{a,b} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different within either the normocholesterolaemic or hypercholesterolaemic group according to the Bonferroni test.
^{*} Volunteers completed a 72 h food intake report, and energy intake and dietary composition were calculated using the program DIAL (Department of Nutrition and Bromatology I, Pharmacy Faculty, UCM), and polyphenol intake was assessed using www.phenol-explorer.eu taking into account the Folin–Ciocalteu method.
[†] P values were assessed using the general linear model of variance for repeated measures.

Cocoa rises HDL, reduces glucose, IL-1β and -10

127

in contrast to that of IL-10 levels, which was significantly lower ($P=0.001$). The value of monocyte chemoattractant protein-1 levels was within the normal range (32–147 ng/ml) and did not vary after the interventions.

The value of VCAM-1 levels in the normocholesterolaemic group was close to the higher limit of the normal physiological range (46–166 ng/ml), and in the hypercholesterolaemic group, the value of the observed levels was above the upper limit. In contrast, the values of ICAM-1 levels in both groups were within the physiological range (39–79 ng/ml)⁽⁴⁰⁾, with that of the hypercholesterolaemic group being near the upper limit. The consumption of cocoa led to a slight decrease in the value of ICAM-1 levels in the normocholesterolaemic group and in that of VCAM-1 levels in the hypercholesterolaemic group (Table 4).

Blood pressure parameters

Based on the systolic and diastolic blood pressure results (Table 5), the subjects were normotensive (systolic blood pressure <140 mmHg and diastolic blood pressure ≥80 mmHg) at the start and end of the interventions, since no changes were observed. All blood pressure values throughout the study were higher in the hypercholesterolaemic group than in the normocholesterolaemic group. No changes were observed regarding heart rate.

Oxidation and antioxidant biomarkers

The levels of MDA and carbonyl group biomarkers did not show statistical changes (Table 5).

The ferric reducing power in serum evaluated by the ferric reducing/antioxidant power method was slightly increased at the end of the intervention periods, without reaching the level of statistical significance. Similarly, oxygen radical absorbance capacity and ABTS values in serum showed no significant differences after the M and C + M interventions (Table 5).

Anthropometric measurements

The consumption of cocoa did not induce an increase in body weight or changes in the other anthropometric parameters measured except for a significant decrease ($P<0.001$) in the tricipital skin folds (Table 6). However, the percentage of body fat calculated from the skin-fold data did not show statistical differences and nor did any other anthropometric parameters.

Physical activity

The occupation of all the volunteers involved low physical activity levels; therefore, their energy expenditure was calculated by taking into account only leisure time, and no statistical differences were observed throughout the study. The normocholesterolaemic group showed a mean energy expenditure of 993.96 (SEM 92.43) at baseline, 922.93 (SEM 124.14) at the M intervention stage and 833.60 (SEM 104.72) at the C + M intervention stage. The hypercholesterolaemic



Table 3. Effects of the consumption of the cocoa product rich in dietary fibre on biochemical parameters (Mean values with their standard errors)

	Normocholesterolaemic (n 24)						Hypercholesterolaemic (n 20)					
	Baseline		M intervention		C + M intervention		Baseline		M intervention		C + M intervention	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Total cholesterol (mg/l)	1644	32.2	1700	49.6	1660	40.0	2100	26.6	2160	45.4	2130	71.8
HDL-C (mg/l)	584 ^a	23.8	626 ^a	33.9	661 ^b	36.6	538 ^a	28.2	547 ^a	31.3	589 ^b	26.0
LDL-C (mg/l)	921	38.3	857	48.6	869	39.7	1300	42.9	1320	39.1	1280	73.0
TRAG (mg/l)	664	59.4	629	62.3	663	50.8	981	73.0	951	78.4	977	76.9
Uric acid (mg/l)	49.7	3.0	46.7	2.2	44.8	2.2	46.2	2.9	46.4	3.1	46.4	3.2
Urea (mg/l)	251 ^a	10.6	271 ^a	11.1	293 ^b	13.7	276 ^a	17.3	309 ^b	20.2	297 ^b	18.9
Creatinine (mg/l)	7.5	0.3	7.7	0.4	7.2	0.3	7.4	0.3	7.8	0.4	7.0	0.3
Glucose (mg/l)	814	12.5	794	17.2	775	17.2	801	14.8	806	17.6	772	21.3
ALT (mg/l)	115 ^a	16.0	180 ^b	18.5	151 ^b	9.6	126 ^a	15.6	171 ^b	12.8	197 ^b	2.21
AST (mg/l)	163 ^a	10.6	191 ^b	9.7	188 ^b	9.7	168	14.0	184	11.8	195	13.1

M, milk; C + M, cocoa + milk; C, cocoa; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.
^{a,b} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different within either the normocholesterolaemic or hypercholesterolaemic group according to the Bonferroni test.
^{*} P values were assessed using the general linear model of variance for repeated measures.

B. Sarriá *et al.*

group exhibited a mean energy expenditure of 742.36 (SEM 101.25) at baseline, 664.18 (SEM 135.99) at the M intervention stage and 631.63 (SEM 114.71) at the C + M intervention stage.

Discussion

The present study shows that regular consumption of a soluble cocoa product rich in DF as part of a typical Mediterranean-Spanish diet increases the intake of DF to the recommended levels and improves cardiovascular health by increasing HDL-C levels and decreasing glucose, IL-1 β and IL-10 levels without leading to weight gain or other anthropometric changes.

Soluble cocoa powder is widely consumed in many different countries including Spain⁽⁴¹⁾ by different population groups, particularly as part of breakfast or between main meals. The consumption rate of two cocoa beverages per day reproduces real conditions in the Spanish population and may be considered moderate (<http://www.cacaoychocolate.com/consumoen.html>). The servings used correspond to the quantity of the product that can reasonably be expected to be consumed. In fact, the optimal health effects of cocoa on coronary artery disease prevention have been associated with a moderate intake, while healthy outcomes disappear at a high intake⁽⁴²⁾.

Three important confounding factors, diet, physical activity and weight gain, were controlled throughout the present study. Regarding diet, this was a study with free-living subjects and the only dietary modification introduced, apart from consuming the cocoa product, was the restriction of the consumption of other cocoa products and the fruit and vegetables mentioned previously. All the methods used to estimate food intake present limitations; nevertheless, in order to obtain the most accurate data from the 72 h dietary records, the volunteers were trained to fill them out and meetings were held to reinforce dietary instructions and assist the volunteers to complete the records as precisely as possible. The intake of polyphenols (Table 2) increased after the consumption of cocoa and milk in both the groups due to the phenolic content of cocoa, which is particularly rich in monomeric (epicatechin and catechin) and oligomeric (procyanidins) flavonols^(15,43), although the increase was not statistically significant probably owing to the restriction of the consumption of fruit and vegetables containing high amounts of antioxidant compounds.

The intake of carbohydrates in both the study groups at the beginning and end of the study (Table 2) was below the recommended range according to the study of Moreiras *et al.*⁽³⁹⁾. Contrarily, lipid and protein intake levels in the normocholesterolaemic group were within the recommended range at baseline, in contrast to those in the hypercholesterolaemic group, which were slightly above the respective recommended nutrient ranges. The levels of both macronutrients increased, although not significantly in the case of carbohydrates after regular intake of cocoa and milk, which may be explained by the sucrose (34.4%) and DF (33.9%) content in the cocoa product and protein in milk. In accordance, the values of serum urea levels were significantly higher ($P=0.001$) after the consumption of cocoa compared with



Table 4. Effects of the consumption of the cocoa product rich in dietary fibre on cytokine and cell adhesion molecule levels (Mean values with their standard errors)

	Normocholesterolaemic (n 24)						Hypercholesterolaemic (n 20)					
	Baseline			M intervention			C + M intervention			Baseline		
	Mean	SEM		Mean	SEM		Mean	SEM		Mean	SEM	
IL-1 β (pg/ml)	3.43	0.32		2.62	0.27		2.47	0.28		2.80	0.39	
IL-6 (pg/ml)	4.30	0.50		3.95	0.56		3.71	0.66		4.16	0.63	
IL-8 (pg/ml)	3.53	0.39		2.80	0.36		2.80	0.33		3.08	0.46	
IL-10 (pg/ml)	13.55 ^a	1.92		9.55 ^{a,b}	1.26		6.68 ^b	1.26		14.47 ^a	2.19	
TNF- α (pg/ml)	6.24	0.61		4.91	0.48		4.65	0.57		6.00	0.78	
MCP-1 (pg/ml)	102.4	6.26		93.1	6.23		102.1	7.59		94.5	6.58	
VCAM-1 (ng/ml)	178.2	15.4		174.7	15.5		186.6	14.6		192.8	17.4	
ICAM-1 ng/ml	49.9	12.2		46.1	12.1		43.0	11.0		74.8	17.0	

M, milk; C + M, cocoa + milk; C, cocoa; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; ICAM-1, intracellular cell adhesion molecule 1.
^{a,b} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different within either the normocholesterolaemic or hypercholesterolaemic group according to the Bonferroni test.
^{*} P values were assessed using the general linear model of variance for repeated measures.

baseline values (Table 3), although they remained within the SEQC reference range (10–50 mg/ml), in contrast to those of serum creatinine levels, which were decreased ($P=0.005$), but remained within the SEQC reference range (5.0–13.0 mg/l). There is no gold standard method for evaluating the intake of DF. However, the assessment of the intake of DF using dietary food records is a well-accepted alternative, particularly if the influence of smoking, alcohol intake, sex and education is considered⁽⁴⁴⁾. These factors were controlled, as the volunteers who participated in the present study were non-smokers, consumed very low amounts of alcohol and had a similar medium-high education level. In both the groups, the intake of DF at baseline and after the M intervention was within the range estimated in the Spanish population (16.3–18.4 g/d)⁽⁴⁵⁾ and below that in European countries (18.5 g/d)⁽⁴⁶⁾. The consumption of cocoa significantly increased the intake of DF ($P<0.001$) and the recommended levels (25 and 28 g/d in women and men, respectively)⁽⁴⁷⁾ would have been reached had cocoa been included in the normal diet of the volunteers without any restrictions.

After the consumption of the cocoa product, no changes in the total lipid levels or in the intake of SFA were observed. In accordance with that study of Cooper *et al.*⁽⁴¹⁾, the fatty acid composition of cocoa had neutral effects on blood lipid and lipoprotein levels, except on HDL-C levels, which were significantly higher ($P=0.008$). The HDL-C level-increasing effect of cocoa had already been described in 1994⁽⁴⁸⁾ in healthy subjects who consumed a diet containing a moderate amount of milk chocolate (46.2 g/d) *v.* a group who consumed an isoenergetic high-carbohydrate snack. Similarly, the HDL-C effect has recently been described in high-risk CVD patients who regularly consumed 40 g of cocoa powder with milk for 4 weeks⁽⁴⁹⁾, as well as in other studies performed in patients with hypercholesterolaemia⁽⁸⁾ and in healthy subjects⁽⁶⁾. Interestingly, according to the meta-analysis carried out by Hooper *et al.*⁽⁵⁰⁾, the beneficial effects on HDL-C levels are greater in longer-term trials. Different mechanisms have been postulated for the rise in HDL-C levels induced by cocoa polyphenols such as the increase in the expression and secretion of apoA1, the synthesis of apoA1 and apoA2, the efflux cholesterol promoter and ATP-binding cassette transporter A1, and the activity of phospholipid transfer proteins as well as decreases in the levels of cholesteryl ester transfer protein and the possible formation of micelles in the intestine, thus modifying fat absorption⁽⁴⁹⁾. In addition, the DF present in cocoa more than likely contributed to the up-regulation of HDL-cholesterol levels in accordance with previous studies^(14,15). To a certain extent, the present results are in contrast with those reported by Tokede *et al.*⁽⁵¹⁾, who concluded that the consumption of dark chocolate/cocoa products induces beneficial effects on LDL levels and neutral effects on TAG and HDL levels in short- and intermediate-term interventions, although dark chocolate seems to be a more effective matrix for delivering flavanols than cocoa beverages.

Other mechanisms may underlie the cardiovascular benefits of DF, such as the reduction of postprandial glucose concentrations, as fibre-rich foods can delay glucose absorption from the small intestine⁽⁵²⁾ and improve insulin sensitivity⁽⁵³⁾.



Table 5. Effects of the consumption of the cocoa product rich in dietary fibre on oxidation and antioxidant biomarker levels, blood pressure and heart rate (Mean values with their standard errors)

	Normocholesterolaemic (n 24)						Hypercholesterolaemic (n 20)						C × group
	Baseline			M intervention			C + M intervention			Baseline			C
	Mean	SEM		Mean	SEM		Mean	SEM		Mean	SEM		P*
Blood pressure (mmHg)													
Systolic	116	1.94		115	2.01		114	2.04		121	2.87		NS
Diastolic	72.1	1.65		72.0	1.25		72.0	1.36		76.4	2.13		NS
Heart rate (bpm)	67.2	2.04		67.7	2.34		67.2	1.88		73.9	2.67		NS
Oxidation and antioxidant biomarkers (μM TE)													
MDA (nmol/ml)	2.25	0.11		2.25	0.12		2.29	0.15		2.50	0.14		NS
Carbonyl (nmol CG/g protein)	0.21	0.08		0.17	0.08		0.21	0.08		0.15	0.08		NS
FRAP	573	20.2		552	17.9		567	22.4		568.4	23.41		0.038
ORAC	16193	338		16087	292		15920	397		15150	647		NS
ABTS	3689	75		3597	49		3695	80		3696	69		NS

M, milk; C + M, cocoa + milk; C, cocoa; bpm, beats per min; TE, Trolox equivalents; MDA, malondialdehyde; FRAP, ferric reducing/antioxidant power; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; ABTS, free radical 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonyl acid)-scavenging capacity.

* P values were assessed using the general linear model of variance for repeated measures.

In fact, long-term, prospective observational studies have suggested that diets containing larger quantities of whole grains and DF are associated with a reduced risk of type 2 diabetes⁽⁵⁴⁾. However, in the meta-analysis mentioned previously⁽⁵⁰⁾, significant reductions in fasting serum insulin concentrations were described after cocoa interventions, but no effects were observed on fasting glucose levels. In contrast, in the present study, serum glucose levels were significantly decreased ($P=0.038$), which is in line with the hypoglycaemic results described in moderately hypercholesterolaemic subjects after the consumption of a fibre-rich cocoa product for 8 weeks⁽⁸⁾.

Inflammation and endothelial dysfunction are important contributors to the development of atherosclerosis. IL-6 and TNF-α levels may be stronger predictors of incident cardiovascular events than CRP levels, as any dietary influence would first influence IL-6 and TNF-α levels⁽²⁴⁾. In the present study, no significant changes in the levels of pro-inflammatory cytokines were observed after the consumption of cocoa and milk, although they were slightly decreased, in contrast to that observed in *in vitro* studies that indicate that cocoa exerts anti-inflammatory effects via TNF-α⁽¹⁾. IL-10 directly inhibits the release of inflammatory cytokines by monocytes and neutrophils and can dampen the inflammatory response by inhibiting Th1-cell cytokine production. The anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of IL-10 have been demonstrated using several models of atherosclerosis in mice. In human subjects, the expression of IL-10 has been demonstrated in both coronary arteries and atherosclerotic plaques, and higher serum levels of IL-10 have been shown in atherosclerosis patients compared with controls, suggesting that the levels of IL-10, as an anti-inflammatory molecule, may be elevated in response to the pro-inflammatory environment of atherosclerosis⁽⁵⁵⁾. In agreement with this, in the present study, the value of IL-10 levels was higher in the hypercholesterolaemic subjects *v.* the normocholesterolaemic subjects. Surprisingly, the values of IL-10 levels were significantly decreased after the C + M intervention in both the groups, being 50% lower than their respective baseline ranges. IL-10 is involved in the inflammatory response by the down-regulation of the synthesis of other cytokines, including that of IL-1β⁽⁵⁶⁾, which is in accordance with the statistically significant reduction of IL-1β levels ($P=0.011$) observed in the present study. *In vitro* studies have shown that smaller flavanol fractions (monomer through tetramers) induce an anti-inflammatory response by suppressing IL-1β mRNA expression and protein secretion⁽⁵⁷⁾. Nevertheless, no changes were observed in IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 levels throughout the study.

Soluble adhesion molecules are early biomarkers of alterations in vascular function that indirectly indicate vascular inflammation and endothelial cell activation. Dissimilar effects of flavanol-rich foods on cell adhesion molecule levels have been described. A low-dose intake of white and red wine decreases the serum concentrations of ICAM-1; however, only red wine decreases the serum concentrations of VCAM-1⁽⁵⁸⁾. In contrast, black tea lowers soluble P-selectin levels without affecting soluble ICAM-1 and VCAM-1 levels⁽⁵⁹⁾.



Table 6. Effects of the consumption of the cocoa product rich in dietary fibre on anthropometric parameters (Mean values with their standard errors)

	Normocholesterolaemic (n 24)						Hypercholesterolaemic (n 20)						C P*	C × group P*
	Baseline		M intervention		C + M intervention		Baseline		M intervention		C + M intervention			
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM		
Body weight (kg)	67.0	2.72	67.0	2.74	67.1	2.74	68.6	2.98	68.9	3.00	69.2	3.00	NS	NS
BMI (kg/m ²)	23.0	0.70	22.8	0.71	23.1	0.71	24.1	0.77	24.2	0.78	24.3	0.78	NS	NS
Skin folds (mm)														
Tricipital	18.3	1.33 ^a	16.7	1.38 ^b	17.1	1.39 ^b	21.3	1.46	19.9	1.52	20.6	1.50	<0.001	NS
Subscapular	13.0	1.05	12.3	1.06	12.5	0.98	16.2	1.14	16.0	1.16	16.1	1.07	NS	NS
Circumferences (cm)														
Brachial	28.5	0.70	28.6	0.80	28.1	0.72	29.2	0.76	28.7	0.87	28.9	0.80	NS	NS
Waist	77.6	2.41	74.1	2.22	74.5	2.28	79.8	2.64	78.4	2.43	78.9	2.50	NS	NS
Abdominal	85.3	1.73	84.2	1.89	85.4	1.79	89.1	1.89	89.3	2.07	89.6	1.96	NS	NS
Hip	98.3	1.24	98.4	1.27	97.3	1.47	99.2	1.36	99.1	1.39	99.6	1.61	NS	NS
Thigh	53.7	1.33	53.0	0.90	53.1	0.91	53.9	1.46	53.7	0.98	53.4	1.00	NS	NS

M, milk; C + M, cocoa + milk; C, cocoa.

^{a,b} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different within either the normocholesterolaemic or hypercholesterolaemic group according to the Bonferroni test.

* P values were assessed using the general linear model of variance for repeated measures.

Hypercholesterolaemic postmenopausal women who consumed a high-flavanol cocoa beverage (446 mg of total flavanols) for 6 weeks had significantly lower levels of sVCAM-1 compared with those consuming the low-flavanol cocoa beverage (43 mg of total flavanols)⁽²²⁾, with epicatechin and certain B-type dimers, as well as their related metabolites, being the candidates for the effects of high-flavanol cocoa beverage, as they inhibit the activation of the oxidative stress-sensitive nuclear transcription factor NF- κ B, a known promoter of VCAM-1 expression⁽²²⁾. In the present study, VCAM-1 levels were slightly decreased; this small effect can be greatly attributed to cocoa polyphenols and their metabolites, as other flavanol-rich foods had been restricted during the study. In the hypercholesterolaemic group, ICAM-1 levels remained similar in contrast to that observed in a previous study⁽⁶⁰⁾ in high-risk CVD subjects in whom ICAM-1 levels were significantly decreased after consuming 40 g of cocoa powder with milk (495 mg of total polyphenols). Once again, the lack of effects on ICAM-1 levels in the present study may be attributed to the flavanol-rich food restrictions.

Observational data on the relationship between cocoa intake and cardiovascular health suggest that the consumption of cocoa is associated with lower blood pressure. When subgrouping by epicatechin dose, greater effects were observed at doses >50 mg/d⁽⁵⁰⁾. Accordingly, regular consumption of two servings of the cocoa product rich in fibre provided 9.3 mg/d of epicatechin (M Gomez-Juaristi, unpublished results) and did not induce hypotensive effects in the normocholesterolaemic or hypercholesterolaemic group. In addition, the participants of the present study were normotensive at baseline, and thus the present results are in agreement with those reported by Ried *et al.*⁽⁶¹⁾, who observed a significant reduction of blood pressure in hypertensive subjects but not in normotensive subjects after the consumption of cocoa, and with those of a previous study carried out in our group in moderately hypercholesterolaemic subjects whose diastolic blood pressure was near

the lower limit of the range of high blood pressure at baseline⁽²⁰⁾.

There was no significant effect on lipid and protein oxidation biomarker levels and on serum ferric reducing power, free radical-scavenging activity *in vivo* or oxygen radical absorbance capacity. As the contribution of fruit and vegetables to the antioxidant status of the volunteers had been reduced, it seems that plasma cocoa polyphenols did not reach a concentration high enough or were not in a chemical form to show antioxidant activity, which is in line with the results reported by Turner *et al.*⁽⁶²⁾ and Rimbach *et al.*⁽⁶³⁾ However, it should not be disregarded that the study was not powered to evaluate changes in antioxidant parameters and also that when chocolate is mixed with milk the absorption of antioxidants is reduced⁽⁶⁴⁾.

With respect to the remaining confounding factors, physical activity and weight gain, energy expenditure at leisure time was relatively high. The assumption that one metabolic equivalent is approximately 4.2 kJ/min (1 kcal/min) may have led to an overestimation of energy expenditure. Nevertheless, that the physical activity level was not different throughout the study makes the possible influence of this factor uniform. Accordingly, none of the anthropometric parameters measured, weight, BMI, subscapular skin folds, or the brachial, waist, abdominal, hip and thigh circumferences, showed changes (Tables 1 and 6). A significant decrease in the tricipital skin folds in both the groups was observed, but this result was not supported by the biometry data. Therefore, the results of the present study are in line with that of Buijsse *et al.*⁽⁶⁵⁾, who reported that energy intake is higher in dark chocolate consumers than in non-consumers; however, the BMI was lower in the former group, although we did not observe a decrease in BMI. This 'antiobesity' effect has been attributed to the physiological activity of polyphenols, which has been described in human subjects who consumed tea⁽⁶⁶⁾ and rats that consumed cocoa⁽⁶⁷⁾. In the latter study, the



antiobesity effects of cocoa polyphenols were explained by the modulation of lipid metabolism, especially by decreasing fatty acid synthesis and transport system activity, and the enhancement of part of the thermogenesis mechanism in the liver and white adipose tissue.

The present study has limitations: the lack of blinding of subjects and investigators may have led to certain bias; the number of subjects was relatively small; treatment duration was relatively short to predict the effects of habitual cocoa intake on the cardiovascular parameters studied. Finally, it is not possible to specify to what extent the observed effects are due to DF, polyphenols or other ingredients of cocoa.

Concluding remarks

In recent years, there has been growing interest in cocoa and health. Although many studies have shown that cocoa induces cardioprotective effects, certain related aspects need to be clarified. This was the aim of the present study, in which the effects of regular consumption of a cocoa product rich in fibre (33.9% TDF, providing 10.17 g of TDF and 416.4 mg of polyphenols/d) within a typical Mediterranean-Spanish diet were assessed. According to the results obtained, it may be concluded that:

- (1) cocoa is an efficacious alternative to increase the intake of DF to the recommended levels, without leading to weight gain or other anthropometric changes;
- (2) it increases serum HDL-C levels, without affecting other lipid or lipoprotein parameters;
- (3) it decreases plasma IL-1 β and IL-10 concentrations and slightly lowers other pro-inflammatory molecule concentrations;
- (4) it reduces fasting serum glucose levels without changing fasting serum antioxidant or blood pressure values;
- (5) there are no differences in the effects observed between the moderately hypercholesterolaemic and normocholesterolaemic subjects.

In contrast to chocolate, where the long-term side effects and optimal dose need to be questioned, we conclude that regular and moderate consumption of cocoa might be a worthwhile dietary approach for improving cardiovascular health.

Acknowledgements

The authors thank the volunteers who participated in the present study, Laura Barrios for her statistical assistance and Aránzazu Fernández-Espinoza for her technical assistance. They also acknowledge Project Consolider-Ingenio (CSD 2007-00063) from the Spanish Ministry of Science and Innovation. S. M.-L. thanks the Spanish National Research Council for her predoctoral fellowship under the JAE-Pre programme funded by the European Social Fund. The present study was funded by Nutrexpa S.L. The authors' contributions were as follows: L. B. was involved in the trial conception, design and data interpretation; S. M.-L. and B. S. conducted the study and carried out the statistical analysis of data; S. M.-L., B. S. and R. M. carried out the assays and interpreted the

results; J. L. S.-C. and L. G.-D. carried out the anthropometric measurements and statistically analysed the corresponding data; B. S. wrote the initial draft and all authors critically reviewed it and contributed to the final version of the manuscript. There are no conflicts of interest.

References

1. Selmi C, Cocchi CA, Lanfredini M, *et al.* (2008) Chocolate at heart: the anti-inflammatory impact of cocoa flavonoids. *Mol Nutr Food Res* **52**, 1340–1348.
2. Jenkins DJA, Kendall CWC, Vuksan V, *et al.* (2000) Effect of cocoa bran on low-density lipoprotein oxidation and fecal bulking. *Arch Intern Med* **160**, 2374–2379.
3. Rimbach G, Melchin M, Moehring J, *et al.* (2009) Polyphenols from cocoa and vascular health – a critical review. *Int J Mol Sci* **10**, 4290–4309.
4. European Food Safety Agency (2010) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to cocoa flavanols and protection of lipids from oxidative damage (ID 652, 1506, 3143), and maintenance of normal blood pressure (ID 1507) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No. 1924/2006. *EFSA J* **8**, 1792 [21 pp.].
5. European Food Safety Agency (2012) Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No. 1924/2006. *EFSA J* **10**, 2809 [21 pp.].
6. Davison K, Coates AM, Buckley JD, *et al.* (2008) Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *Inter J Obes* **32**, 1289–1296.
7. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, *et al.* (2012) Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr* **95**, 740–751.
8. Ried K, Sullivan TR, Fakler P, *et al.* (2012) Effect of cocoa on blood pressure. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, issue 8, CD008893.
9. Ding EL, Hutfless SM, Ding X, *et al.* (2006) Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr Metab* **3**, 2.
10. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, *et al.* (2004) Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic Biol Med* **37**, 1351–1359.
11. Mathur S, Devaraj S, Grundy SM, *et al.* (2002) Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr* **132**, 3663–3667.
12. Baba S, Natsume M, Yasuda A, *et al.* (2007) Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr* **137**, 1436–1441.
13. Fogliano V, Corollaro ML, Vitaglione P, *et al.* (2011) *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Mol Nutr Food Res* **55**, S44–S55.
14. Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, *et al.* (2006) Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* **92**, 119–120.
15. Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, *et al.* (2007) Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* **116**, 2376–2382.



16. Lecumberri E, Mateos R, Izquierdo-Pulido M, *et al.* (2007) Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem* **104**, 948–954.
17. Wu H, Dwyer KM, Fan Z, *et al.* (2003) Dietary fiber and progression of atherosclerosis: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *Am J Clin Nutr* **78**, 1085–1091.
18. Tillotson JL, Grandits GA, Bartsch GE, *et al.* (1997) Relation of dietary fiber to blood lipids in the special intervention and usual care groups in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Clin Nutr* **65**, 327S–337S.
19. Lecumberri E, Goya L, Mateos R, *et al.* (2007) A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition* **23**, 332–341.
20. Sarriá B, Mateos R, Sierra-Cinos JL, *et al.* (2012) Hypotensive, hypoglycaemic and antioxidant effects of consuming a cocoa product in moderately hypercholesterolemic humans. *Food Funct* **3**, 867–874.
21. Di Giuseppe R, Castelnuevo AD, Centritto F, *et al.* (2008) Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in healthy Italian population. *J Nutr* **138**, 1939–1945.
22. Wang-Polagruto JF, Villablanca AC, Polagruto JA, *et al.* (2006) Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Pharmacol* **47**, Suppl. 2, S177–S186.
23. Ostertag LM, O’Kennedy N, Kroon PA, *et al.* (2010) Impact of dietary polyphenols on human platelet function – a critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol Nutr Food Res* **54**, 60–81.
24. Ma Y, Hebert JR, Li W, *et al.* (2008) Association between dietary fiber and markers of systemic inflammation in the Women’s Health Initiative Observational Study. *Nutrition* **24**, 941–949.
25. Qi L, van Dam RM, Liu S, *et al.* (2006) Wholegrain, bran, and cereal fiber intakes and markers of systemic inflammation in diabetic women. *Diabetes Care* **29**, 207–211.
26. Saura-Calixto F, García-Alonso A, Goñi I, *et al.* (2000) *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *J Agric Food Chem* **48**, 3342–3347.
27. Scott RW (1979) Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Anal Chem* **51**, 936–941.
28. Southgate DAT (1976) *Determination of Food Carbohydrates*. London: Applied Science Publishers Ltd.
29. Bravo L & Saura-Calixto F (1998) Characterization of the dietary fiber and the *in vitro* indigestible fraction of grape pomace. *Am J Enol Viticult* **49**, 135–141.
30. Cienfuegos-Jovellanos E, Quiñones MM, Muguerza B, *et al.* (2009) Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J Agric Food Chem* **57**, 6156–6162.
31. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, *et al.* (2005) Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **827**, 76–82.
32. Richert S, Wehr NB, Stadtman ER, *et al.* (2002) Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. *Arch Biochem Biophys* **397**, 430–432.
33. Pulido R, Bravo L & Saura-Calixto F (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* **48**, 3396–3402.
34. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, *et al.* (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**, 1231–1237.
35. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, *et al.* (2002) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* **50**, 4437–4444.
36. Siri WE (1961) Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. In *Techniques for Measuring Body Composition*, pp. 223–244 [J Brozek and A Henschel, editors]. Washington, DC: National Academy of Sciences.
37. Durnin JVGA & Womersley J (1974) Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* **32**, 77–97.
38. Martínez-González MA, López-Fontana C, Varo JJ, *et al.* (2005) Validation of the Spanish version of the physical activity questionnaire used in the Nurses’ Health Study and the Health Professionals’ Follow-up Study. *Public Health Nutr* **8**, 920–927.
39. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, *et al.* (2009) *Tablas de composición de alimentos (Food Composition Tables)*, 13th ed. Madrid: Ediciones Pirámide S.A..
40. Kokkonen H, Söderstrom I, Rocklöv J, *et al.* (2010) Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **62**, 383–391.
41. Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, *et al.* (2008) Cocoa and health: a decade of research. *Br J Nutr* **99**, 1–11.
42. Di Castelnuevo A, di Giuseppe R, Lacoviello L, *et al.* (2012) Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease. *Eur J Intern Med* **23**, 15–25.
43. Gómez-Juaristi M, González-Torres L, Bravo L, *et al.* (2011) Beneficial effects of chocolate on cardiovascular health. *Nutr Hosp* **26**, 289–292.
44. Loening-Baucke V, Miele E & Staiano A (2004) Fiber (glucomannan) is beneficial in the treatment of childhood constipation. *Pediatrics* **113**, 259–264.
45. Saura-Calixto FD & Goñi I (2004) The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. *Eur J Clin Nutr* **58**, 1078–1082.
46. Tabernerero M, Serrano J & Saura-Calixto F (2007) Dietary fiber intake in two European diets with high (Copenhagen, Denmark) and low (Murcia, Spain) colorectal cancer incidence. *J Agric Food Chem* **55**, 9443–9449.
47. Kassis AN, Santosa S & Jones PJH (2009) Potential health claims on dietary fiber: how robust is the evidence? *Int J N M* **4**, 28–32.
48. Kris-Etherton PM & Mustad VA (1994) Chocolate feeding studies: a novel approach for evaluating the plasma lipids effects of stearic acid. *Am J Clin Nutr* **60**, 1029S–1036S.
49. Khan N, Monagas M, Andres-Lacueva C, *et al.* (2011) Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **22**, 1046–1053.
50. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, *et al.* (2008) Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* **88**, 38–50.



51. Tokede OA, Gaziano JM & Djoussé L (2011) Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* **65**, 879–886.
52. Giacco R, Parillo M, Rivellese AA, *et al.* (2000) Long-term dietary treatment with increased amounts of fiber-rich low-glycemic index natural foods improves blood glucose control and reduces the number of hypoglycemic events in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* **23**, 1461–1466.
53. van der Du DLA, Boshuizen HC, Forouhi NG, *et al.* (2009) Dietary fiber and subsequent changes in body weight and waist circumference in European men and women. *Am J Clin Nutr* **91**, 329–336.
54. Schulze M, Hoffmann K, Manson J, *et al.* (2005) Dietary pattern, inflammation, and incidence of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr* **82**, 675–682.
55. Lakoski SG, Liu Y, Brosnihan KB, *et al.* (2008) Interleukin-10 concentration and coronary heart disease (CHD) event risk in the estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study. *Atherosclerosis* **197**, 443–447.
56. Heiskanena M, Kähönen M, Hurme M, *et al.* (2010) Polymorphism in the IL10 promoter region and early markers of atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis* **208**, 190–196.
57. Mao TK, Powell JJ, van de Water J, *et al.* (2000) The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* **66**, 1377–1386.
58. Sacanella E, Vázquez-Agell M, Mena MP, *et al.* (2007) Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* **86**, 1463–1469.
59. Hodgson JM, Puddey IB, Mori TA, *et al.* (2001) Effects of regular ingestion of black tea on haemostasis and cell adhesion molecules in humans. *Eur J Clin Nutr* **55**, 881–886.
60. Monagas M, Khan N, Andrés-Lacueva C, *et al.* (2009) Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* **90**, 1144–1150.
61. Ried K, Sullivan T, Fakler P, *et al.* (2010) Does chocolate reduce blood pressure? A meta-analysis. *BMC Med* **8**, 39–49.
62. Turner R, Baron T, Wolfram S, *et al.* (2004) Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein. *Free Radic Res* **38**, 209–216.
63. Rimbach G, Weinberg PD, de Pascual-Teresa S, *et al.* (2004) Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta* **1670**, 229–237.
64. Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, *et al.* (2003) Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* **424**, 1013.
65. Buijsse B, Feskens EJM, Kok FJ, *et al.* (2006) Cocoa intake, blood pressure and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* **166**, 411–417.
66. Nagao T, Komine Y, Soga S, *et al.* (2005) Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am J Clin Nutr* **81**, 122–129.
67. Matsui N, Ito R, Nishimura E, *et al.* (2005) Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition* **21**, 594–601.

Artículo 4.

Realistic intake of a flavanol-rich soluble cocoa product increases HDL-cholesterol without inducing anthropometric changes in healthy and moderately hypercholesterolemic subjects.

Sara Martínez-López, Beatriz Sarriá, José Luis Sierra-Cinos, Luis Goya, Raquel Mateos, Laura Bravo

Food & Function (2014), 5(2), 364-374 (doi: 10.1039/c3fo60352k)

Cite this: DOI: 10.1039/c3fo60352k

Realistic intake of a flavanol-rich soluble cocoa product increases HDL-cholesterol without inducing anthropometric changes in healthy and moderately hypercholesterolemic subjects

Sara Martínez-López,^{†a} Beatriz Sarriá,^{†*a} José Luis Sierra-Cinos,^b Luis Goya,^a Raquel Mateos^a and Laura Bravo^{*a}

To assess whether antioxidant, anti-inflammatory and other cardio-protective effects attributed to cocoa are achieved when regularly consuming moderate amounts of a flavanol-rich soluble cocoa product, a non-randomized, controlled, crossover, free-living study was carried out in healthy ($n = 24$; 25.9 ± 5.6 years) and moderately hypercholesterolemic ($200\text{--}240\text{ mg dL}^{-1}$; $n = 20$; 30.0 ± 10.3 years) volunteers. Participants consumed two servings per day (7.5 g per serving) of a soluble cocoa product (providing 45.3 mg flavanols per day) in milk, which was compared with consuming only milk during a 4 week period. The effects on systolic and diastolic blood pressure and heart rate were determined, as well as on serum lipid and lipoprotein profiles, interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), vascular (VCAM-1) and intercellular cell adhesion molecules (ICAM-1), serum malondialdehyde (MDA), carbonyl groups (CG), ferric reducing/antioxidant power (FRAP), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and free radical scavenging capacity (ABTS). During the study, the volunteers' diets and physical activity were also evaluated, as well as any changes in weight, skin folds, circumferences and related anthropometric parameters. Cocoa and certain polyphenol-rich fruits and vegetables and their derivatives were restricted. After consuming the cocoa product positive effects were observed such as an increase in serum HDL-C ($p < 0.001$) and dietary fiber intake ($p = 0.050$), whereas IL-10 decreased ($p = 0.022$). Other cardiovascular-related biomarkers and anthropometric parameters were unaffected. We have therefore concluded that regular consumption of this cocoa product in a Spanish-Mediterranean diet may protect against cardiovascular disease in healthy and hypercholesterolemic subjects without producing any weight gain or other anthropometric changes.

Received 22nd August 2013
Accepted 30th November 2013

DOI: 10.1039/c3fo60352k

www.rsc.org/foodfunction

Introduction

A diet rich in flavonoids promotes health and delays the onset of cardiovascular disease. Cocoa contains higher concentrations of flavonoids per serving than tea or red wine,¹ and has been defined as a functional food due to its high flavanol content.² Even so, although flavanols in cocoa are among the most powerful antioxidants identified so far, their bioavailability is relatively low and depends on the matrix in which the polyphenols are delivered.^{3,4} Proteins of the food matrix in which cocoa is consumed might bind flavonoids, reduce their bioavailability and consequently their potential antioxidant

properties *in vivo*.⁵ Recently, polyphenols contained in a water-insoluble cocoa fraction showed antioxidant action despite being bound to macromolecules using an *in vitro* model,⁶ and there are also *in vivo* reports on the antioxidant potential of cocoa flavanols in spite of their limited bioavailability.⁵ After the acute intake of cocoa products an increase in plasma antioxidant status⁷ and a decrease in oxidation parameters⁸ have been described. However, these effects could not be sustained after repeated cocoa consumption. In other chronic studies, varied effects were observed such as a reduction in MDA levels⁹ and plasma-oxidized LDL concentrations;¹⁰ however, F2-isoprostane levels remained unchanged in both plasma¹¹ and urine.¹²

Apart from its antioxidant properties, cocoa has also been shown to have a beneficial effect on endothelial function, lipemia, inflammation and blood pressure, as well as on other cardiovascular-protective properties, which have been attributed to its polyphenol fraction.^{2,4} Nevertheless, to date a cause-effect relationship between the consumption of cocoa flavanols and decreased lipid oxidation has not yet been unequivocally

^aDepartment of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC) Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid, Spain. E-mail: beasarria@ictan.csic.es; lbravo@ictan.csic.es; Fax: +34 915493627; Tel: +34 915492300

^bDepartment of Nutrition and Bromatology I, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid (UCM), Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid, Spain

[†] Sara Martínez-López and Beatriz Sarriá have contributed equally to this work.

established.^{13,14} Conversely, there is enough evidence to establish a relationship between cocoa flavanols and maintenance of endothelium-dependent vasodilation, which contributes to normal blood flow.¹⁵

Most of the knowledge on cocoa flavanols and inflammation has been obtained using *in vitro* experimental models.² More *in vivo* studies are necessary to understand the cumulative effects of regularly consuming cocoa products on cell adhesion molecules and inflammatory biomarkers, since these effects seem to depend on the amount of cocoa consumed¹⁶ and its flavanol content.¹⁷ Moderate consumption of cocoa products inhibits platelet activation and aggregation in healthy and cardiovascular disease risk subjects.^{4,18}

Although cocoa products are high-energy foods, they have been shown to have anti-obesity effects in humans⁵ and rats.¹⁹ In addition, chocolate and other cocoa soluble product manufacturers are actively pursuing ways of producing novel low energy products by lowering sugar and fat levels without compromising the flavor and texture of traditional chocolate.

In view of the foregoing, this work questions whether cardiovascular-related effects can be obtained by regularly consuming a moderate and realistic amount of cocoa powder. The present work has evaluated the effects of regularly consuming a moderate amount of a novel cocoa powder, rich in flavanols and low in sugar, within a balanced Mediterranean-Spanish diet, on cardiovascular related parameters in healthy and moderately hypercholesterolemic subjects. Anthropometric parameters were also controlled.

Materials and methods

Subjects

This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid (Spain). Experiments were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines. Volunteer recruitment was carried out by placing advertisements in the Complutense University campus of Madrid and by giving short talks between lectures. The inclusion criteria for both women and men were: total cholesterol levels <200 mg dL⁻¹ for the normocholesterolemic group and 200–240 mg dL⁻¹ for the hypercholesterolemic subjects,

non-vegetarian, non-smokers, 18 to 55 years old, not suffering from any chronic pathology or gastrointestinal disorder, and in the case of women, not pregnant. Participants should not have taken any dietary supplements, laxatives, or antibiotics six months before the start of the study and their body mass index had to be less than 30 kg m⁻².

Of the fifty volunteers who enrolled in the study, 6 withdrew for personal, health or professional reasons. Of the 44 remaining volunteers, 24 were women with an average age of 25.75 years (SD 6.29) and a body mass index (BMI) of 22.2 (SD 2.42) kg m⁻², and 20 were men with an average age of 32 years (SD 10.04) and a BMI of 25.15 (SD 3.94) kg m⁻². In order to avoid any bias due to gender, the number of men and women in each group was balanced; in the normocholesterolemic group, 46% were men and 54% were women, and in the hypercholesterolemic group 45% were men and 55% were women. The baseline characteristics of the 44 who completed the study, separated by group and gender, are shown in Table 1.

Design

This was a non-randomized, controlled, crossover study of free-living individuals. After a 2 week run-in stage, subjects consumed two 200 mL servings of semi-skimmed milk per day for 4 weeks. So during this milk-intervention stage the total consumption of milk was 400 mL milk per day. Afterwards, subjects consumed two sachets of soluble cocoa powder per day in 200 mL of semi-skimmed milk, one for breakfast, and the other as a snack between lunch and dinner for 4 weeks, resulting in a total intake during this cocoa-intervention stage of 400 mL milk plus cocoa per day. The lengths of the intervention periods are in agreement with previous studies with similar objectives.¹⁴ Blood samples, blood pressure, heart rate and anthropometric measurements were taken at baseline and at the end of each intervention. The trial was held during autumn months. The commercially available soluble cocoa product studied was provided by Nutrexpa S.L. in 7.5 g blind sachets. The cocoa dose used was established taking into account the average cocoa serving in the Spanish population,²⁰ since the objective of the work was to reproduce the habitual consumption pattern in Spain. Furthermore, as the studied cocoa product was rich in cocoa, thus providing a strong cocoa flavour, the dose had to be one that would be largely accepted by the volunteers. For the duration of the study (*i.e.* the run-in

Table 1 Baseline characteristics of the participants in the study^a

	Normocholesterolemic (<i>n</i> = 24)		Hypercholesterolemic (<i>n</i> = 20)	
	Men (<i>n</i> = 11)	Women (<i>n</i> = 13)	Men (<i>n</i> = 9)	Women (<i>n</i> = 11)
Age (years)	28.1 ± 7.9	26.1 ± 6.1	35.7 ± 11.2	25.4 ± 6.8
Weight (kg)	75.2 ± 10.6	60.3 ± 7.7	81.0 ± 14.9	58.8 ± 5.5
B.M.I. (kg m ⁻²)	24.1 ± 3.6	22.0 ± 2.6	26.2 ± 4.2	22.4 ± 2.3
Systolic B.P. (mmHg)	117.4 ± 10.2	115.1 ± 9.1	122.9 ± 15.3	118.9 ± 10.4
Diastolic B.P. (mmHg)	71.8 ± 8.0	72.8 ± 8.4	79.8 ± 10.3	73.9 ± 8.4
Heart rate (bpm)	65.1 ± 10.1	69.1 ± 9.8	63.8 ± 9.5	82.2 ± 8.2

^a Values represent mean ± standard error of mean. B.M.I.: body mass index; B.P.: blood pressure.

and intervention stages) other cocoa products, certain fruits and vegetables (oranges, mandarins, apples, grapes, strawberries, berries in general, beets and onion), as well as their derived beverages, including wine, juices and tea, were completely restricted to reduce interindividual differences in polyphenol intake and to be able to attribute the results observed, for the most part, to the consumption of the cocoa product.

Dietary control and compliance

Apart from the aforementioned restrictions, subjects were asked to maintain the same dietary and lifestyle habits throughout the study. Dietary intake was regularly evaluated to control any possible deviations from the recommendations, and volunteers were instructed on how to fill in the dietary records before starting the study. In the last week of the run-in stage and the two intervention periods, volunteers were asked to complete a 72-hour detailed food intake report, specifying the ingredients and the amounts of food consumed, including serving weights where possible. Compliance was controlled by counting the number of cocoa servings supplied to each volunteer before and after the intervention, and by communicating with the volunteers every week. To assess the dietary composition, the program DIAL (Department of Nutrition and Bromatology I. School of Pharmacy, Complutense University, Madrid) was used. The polyphenol intake was estimated using the <http://www.phenol-explorer.eu> program, and data provided by the Folin–Ciocalteu method.

Soluble cocoa powder

The commercialized soluble cocoa powder used in this study was provided by Nutrexa S.L. together with a general analysis of its composition (6.2% fat, 12.4% proteins, 45% carbohydrates, of which 2.8% were sugar, 24.4% of dietary fibre, 4.5% of moisture and 1.4% of minerals: 0.1% of sodium, 0.6% of calcium and 0.7% of phosphorus). A process for lowering sugar levels of cocoa products without compromising their texture had been used in the production of the cocoa product here studied.

Polyphenols in the cocoa product were extracted following a procedure designed by our group²¹ and analyzed spectrophotometrically as total polyphenols using the Folin–Ciocalteu reagent and gallic acid as standard. The polyphenolic composition in the extracts was characterized by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) using an Agilent 1200 series liquid chromatograph as described elsewhere.²² The total polyphenol concentration of the cocoa product was 34.04 ± 2.28 mg per g product and the total flavanol concentration was 3.02 ± 0.2 mg per g d.m. made up of: epicatechin 1.26 ± 0.18 mg per g d.m., catechin 0.47 ± 0.03 mg per g d.m., procyanidin B1 0.20 ± 0.04 mg per g d.m. and procyanidin B2 1.09 ± 0.10 mg per g d.m. as determined by HPLC-DAD ($n = 6$). Therefore, the two servings of cocoa provided 45.3 mg of flavanols per day (including 18.9 mg epicatechin per day).

The total dietary fiber was 24.9% (unpublished data), and analysis was carried out following the same procedure described in Sarriá *et al.*²³

Blood sampling

Blood samples were drawn after 8–10 h of overnight fasting at baseline and at the end of the milk and cocoa intervention stages. Serum (without anticoagulant) and plasma (EDTA-coated tubes) were separated by centrifugation and frozen at -80°C until analysis.

Biochemical parameter analyses

The lipid profile was determined in serum samples following reference methods or methods recommended by the Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) using the Roche Cobas Integra 400 plus analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Uric acid, creatinine and glucose were analyzed according to standardized spectrophotometric techniques.

Inflammatory biomarker analyses

The cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, IL-8 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were analyzed in plasma samples using the MILLIPLEX MAP High Sensitivity Human Cytokine kit (Millipore Corp., Billerica, MA, USA). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were analyzed using the MILLIPLEX MAP Human Cardiovascular Disease kit on Luminex equipment (Luminex-100/200, Luminex Corporation, Austin, TX, USA). High and low concentration quality controls were used with all the biomarkers. The intra- and inter-assay precision coefficients of variation were: 3.11% and 2.16%, respectively, for IL-1 β ; 3.51% and 4.48%, respectively, for IL-6; 3.49% and 3.78%, respectively, for TNF- α ; 3.31% and 11.84%, respectively, for IL-10; 3.26% and 6.48%, respectively, for IL-8; 11.27% and 13.7%, respectively, for MCP-1; 4.5% and 8.5%, respectively, for VCAM-1; and 7.9% and 9.7%, respectively, for ICAM-1.

Antioxidant and oxidation biomarker analyses

The serum antioxidant capacity was determined by: the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay,²⁴ the free radical scavenging capacity assay using the ABTS radical cation²⁵ and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay²⁶ using Trolox as standard. Results were expressed as μmol of Trolox Equivalent (TE) per gram of dry matter (d.m.) of the product and as μM TE for serum samples. Serum levels of the lipid oxidation biomarker malondialdehyde (MDA) were determined as described previously,²⁷ and carbonyl as a biomarker of protein oxidation were also determined.²⁸ Serum protein was determined using the Bradford reagent.

Blood pressure measurements

Both systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were measured using an automatic arm sphygmomanometer (Pic

Indolor Diagnostic, BS 150, Artsana, Italy). At baseline and at the end of the milk and cocoa intervention stages, between 7:30 and 8:00 a.m., volunteers were asked to rest on a chair for 15 minutes before the cuff was placed on their left arm and the first reading was taken. Subsequently, two more readings were taken after 5-minute resting periods, and if they were not found to be within 10–15 mm Hg a fourth reading was taken.

Anthropometric analysis

Apart from controlling dietary intake and physical activity in order to ascertain that there were no changes in these parameters that might affect the studied cardiovascular biomarkers, anthropometric analyses were also performed as a further control. This was done in order to also assess whether cocoa intervention might affect anthropometry, especially body weight and fat percentages. At baseline and after the two interventions, the volunteers' total body and trunk fat percentages were assessed from tetrapolar bioimpedance measurements using a Tanita segmental body composition analyzer BC-418 MA (Tanita Corp. Tokyo, Japan). The device had a weighing system included, and the height was determined using a Holtain precision mechanical stadiometer (Holtain Ltd., Crymych, United Kingdom). The body mass index was calculated according to the formula weight (kg) per height (m)². Brachial, waist, abdominal, hip and thigh circumferences were measured using a SECA 203 flexible tape (SECA Ltd., United Kingdom). Tricipital and subscapular skinfolds were measured using a Harpenden skinfold caliper (Holtain Ltd., Crymych, United Kingdom). By means of these biometric data, the body density²⁹ and the percentage of body fat³⁰ were calculated.

Physical activity analysis

Participants were asked to maintain their usual level of physical activity during the study. Volunteers filled out a questionnaire before starting the study in order to know their occupation and leisure time activities, and consequently the physical activity involved. In the run-in and the two intervention stages, physical activity was calculated using an adapted version of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire.³¹ We assumed that 1 metabolic equivalent is approximately 1 kcal min⁻¹ for a 70 kg man. As all the volunteers' occupations involved low physical activity, their energy expenditure was calculated by only taking into account leisure time. Data were expressed as kcal per day.

Statistical analysis

Taking total cholesterol as the main variable, an average size of 23 subjects per group was calculated in order to obtain a statistical power of 80 percent that the study would detect a treatment difference at a 0.05 significance level, if the true difference between treatments was 6 mg dL⁻¹. This was based on the assumption that the within-patient standard deviation of the response variable would be 10.

Data have been presented as means \pm standard error of the mean, unless specified otherwise. Before any statistical analysis, all variables were examined for normality using the

Kolmogorov–Smirnov test. A two-factor repeated measure factorial design was used to examine the effects due to time (treatment), and group and time–group interactions. Since the effect on the group and the dietary treatment (time)–group interactions was not significant in any of the parameter analyzed, these statistical results are not included in tables.

Differences within either the normocholesterolemic or hypercholesterolemic groups were studied using the Bonferroni post-hoc test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. The SPSS statistical package (version 19.0; SPSS, Inc., IBM Company) and Statgraphics Centurion XVII (Stat Point Technologies, Inc.) were used.

Results

The 72-hour intake reports provided by volunteers were pre-filtered to exclude any considered unreliable, which were defined as those that showed daily energy intake estimations 70% below light activity energy intake recommendations or 130% above normal activity energy intake recommendations, taking into consideration the age and gender of the group.²⁰ The analysis of the food reports showed that carbohydrate ($p = 0.002$) and protein intake ($p < 0.001$) were statistically higher after consuming the cocoa product with milk (Table 2). According to the paired test, in the normocholesterolemic group the protein intake was significantly higher after the cocoa intervention stage compared to baseline. Also, dietary fiber increased after this stage ($p = 0.050$) due to the dietary fiber provided by the cocoa product, even though recommended intakes were not reached.³² The intake of polyphenols also increased in both groups after the cocoa intervention stage because of the phenolic content of the soluble cocoa product, though only slightly (not statistically significant) owing to the restriction on polyphenol-rich foods. None of the other dietary intake parameters showed statistical differences due to the dietary treatment.

After consuming the cocoa product, the total cholesterol, LDL-C and triglyceride levels did not show any statistical differences, whereas HDL-C had increased significantly ($p < 0.001$; Table 3). In both groups, the HDL-C values achieved after the interventions were higher than their respective baseline concentrations according to the paired tests. Both alanine and aspartate aminotransferase levels increased with respect to baseline in normo- and hypercholesterolemic groups after the milk and cocoa interventions, according to the repeated measures factorial design ($p = 0.001$) and the Bonferroni test. However, both parameters remained within their respective reference ranges of normality established by SEQC (0–41 and 0–38 U L⁻¹, respectively). In contrast to glucose and uric acid levels, which did not change, urea ($p = 0.009$) increased in the normocholesterolemic group when compared to baseline after the milk and cocoa interventions, and creatinine ($p = 0.047$) was higher in both groups after the milk intervention with respect to baseline and the cocoa intervention. Nevertheless, both urea and creatinine values remained within their reference ranges according to SEQC (10–50 mg dL⁻¹ and 0.50–1.30 mg dL⁻¹, respectively).

Table 2 Energy and dietary component intakes after a 2-week run-in stage (baseline), milk intervention (control, 4 weeks) and cocoa intervention (4 weeks)^a

	Normocholesterolemic (<i>n</i> = 24)			Hypercholesterolemic (<i>n</i> = 20)			<i>P</i> *
	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention	
Energy (kcal per day)	2343.63 ± 113.81	2321.12 ± 117.56	2567.69 ± 123.54	2501.79 ± 149.44	2391.57 ± 181.25	2487.00 ± 132.21	N.S.
Dietary fiber (g per day)	17.78 ± 1.47	17.00 ± 1.94	20.57 ± 1.65	18.46 ± 1.57	17.79 ± 2.08	20.69 ± 1.77	0.050
Polyphenols (mg per day)	1406 ± 202	1333 ± 310	1614 ± 273	1518 ± 216	1465 ± 332	1695 ± 291	N.S.
Carbohydrates (g per day)	220.38 ± 9.88	208.69 ± 12.26	254.05 ± 14.15	229.21 ± 17.11	225.57 ± 18.68	240.08 ± 15.13	0.002
Lipids (g per day)	104.51 ± 7.32	104.21 ± 7.14	103.0 ± 6.67	117.36 ± 7.71	110.64 ± 8.10	109.31 ± 7.13	N.S.
Proteins (g per day)	96.56 ± 6.04 ^a	99.23 ± 6.47 ^{ab}	112.10 ± 6.46 ^b	100.79 ± 6.46	99.32 ± 6.88	113.71 ± 6.9	<0.001

^a Values represent mean ± standard error of mean. Statistical analysis: 2 × 2 repeated measures factorial design examining effects of the dietary treatment, group and their interaction. *P** values correspond to the effect of the treatment. The effects of the group and treatment-group interaction were N.S. in all parameters. ^{ab}Mean values within the normocholesterolemic group with unlike superscripts correspond to significant differences according to the Bonferroni test.

Table 3 Biochemical parameters after a 2-week run-in stage (baseline), milk intervention (control, 4 weeks) and cocoa intervention (4 weeks)^a

	Normocholesterolemic (<i>n</i> = 24)			Hypercholesterolemic (<i>n</i> = 20)			<i>P</i> *
	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention	
Total cholesterol (mg dL ⁻¹)	164.76 ± 3.36	168.29 ± 4.06	171.86 ± 3.18	210.17 ± 2.61	217.50 ± 4.45	214.5 ± 7.90	N.S.
HDL-cholesterol (mg dL ⁻¹)	58.41 ± 2.25 ^a	64.73 ± 3.00 ^b	67.54 ± 2.85 ^b	51.11 ± 2.56 ^a	55.67 ± 3.40 ^b	57.06 ± 3.24 ^b	0.001
LDL-cholesterol (mg dL ⁻¹)	88.74 ± 3.64	85.42 ± 4.65	89.58 ± 4.32	129.10 ± 5.34	131.14 ± 4.86	128.64 ± 6.21	N.S.
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	66.41 ± 6.25	62.91 ± 6.63	65.36 ± 7.14	98.06 ± 7.30	95.11 ± 7.84	98.56 ± 7.89	N.S.
Uric acid (mg dL ⁻¹)	5.00 ± 0.30	4.63 ± 0.24	4.59 ± 0.26	4.63 ± 0.32	4.68 ± 0.26	4.74 ± 0.28	N.S.
Urea (mg dL ⁻¹)	25.14 ± 1.34	27.14 ± 1.51	27.64 ± 1.62	29.93 ± 1.65	28.40 ± 1.47	29.53 ± 1.50	0.009
Creatinine (mg dL ⁻¹)	0.75 ± 0.03	0.77 ± 0.03	0.75 ± 0.03	0.74 ± 0.03	0.78 ± 0.04	0.72 ± 0.04	0.047
Glucose (mg dL ⁻¹)	80.81 ± 1.28	78.76 ± 1.66	78.67 ± 1.49	80.11 ± 1.34	80.58 ± 1.76	79.84 ± 1.56	N.S.
ALT (U L ⁻¹)	11.52 ± 1.50 ^a	17.14 ± 1.45 ^b	16.24 ± 1.90 ^b	11.69 ± 1.72 ^a	16.50 ± 1.69 ^b	19.44 ± 2.21 ^b	0.001
AST (U L ⁻¹)	15.90 ± 1.21 ^a	18.85 ± 1.05 ^b	19.40 ± 1.21 ^b	16.67 ± 1.28 ^a	18.44 ± 1.10 ^b	19.78 ± 1.21 ^b	0.001

^a Values represent mean ± standard error of mean. Statistical analysis: 2 × 2 repeated measures factorial design examining effects of the dietary treatment, the group and their interaction. *P** values correspond to the effect of the treatment. The effects of the group were *p* < 0.001 for total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides, in the rest of the parameters it was N.S. The treatment-group interactions were N.S. in all parameters. ^{ab}Mean values within either the normocholesterolemic or hypercholesterolemic group with unlike superscripts correspond to significant differences according to the Bonferroni test.

The levels of inflammatory and adhesion molecules varied considerably (Table 4). IL-1β, IL-6 and IL-8 were within the levels described for healthy subjects (the control group),³³ whereas IL-10 values were above the corresponding levels (2.4–6.6 pg mL⁻¹) and TNF-α values below (14.2–61.7 pg mL⁻¹). IL-1β and MCP-1 concentrations decreased compared to baseline values after consuming the cocoa test beverage, particularly in the

hypercholesterolemic group, but without reaching the level of statistical significance. On the other hand, IL-10 levels were significantly lower (*p* = 0.022) after the cocoa intervention.

VCAM-1 values in the normocholesterolemic group were close to the higher limit of the range (46–166 ng mL⁻¹) described for control subjects,³³ and in the hypercholesterolemic group the values were above the upper limit at baseline. In

Table 4 Cytokine and cell adhesion molecules levels after a 2-week run-in stage (baseline), milk intervention (control, 4 weeks) and cocoa intervention (4 weeks)^a

	Normocholesterolemic (<i>n</i> = 24)			Hypercholesterolemic (<i>n</i> = 20)			<i>P</i> [*]
	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention	
Interleukin-1 β (pg mL ⁻¹)	3.40 \pm 0.33	2.65 \pm 0.28	2.65 \pm 0.32	2.67 \pm 0.35	2.65 \pm 0.29	2.11 \pm 0.33	N.S.
Interleukin-6 (pg mL ⁻¹)	4.32 \pm 0.58	3.82 \pm 0.55	3.73 \pm 1.06	3.94 \pm 0.64	3.72 \pm 0.61	4.28 \pm 1.17	N.S.
Interleukin-8 (pg mL ⁻¹)	3.61 \pm 0.43	2.80 \pm 0.34	3.00 \pm 0.73	3.71 \pm 0.50	3.43 \pm 0.38	4.57 \pm 0.82	N.S.
Interleukin-10 (pg mL ⁻¹)	13.86 \pm 1.68	9.90 \pm 1.47	8.90 \pm 1.45	11.73 \pm 2.0	12.40 \pm 1.7	9.93 \pm 1.7	0.022
TNF- α (pg mL ⁻¹)	6.32 \pm 0.67	4.91 \pm 0.54	5.91 \pm 0.72	5.95 \pm 0.72	7.63 \pm 0.58	6.26 \pm 0.78	N.S.
MCP-1 (pg mL ⁻¹)	102.42 \pm 6.15	93.08 \pm 6.37	99.04 \pm 5.52	94.55 \pm 6.74	88.40 \pm 6.98	85.90 \pm 6.05	N.S.
VCAM-1 (ng mL ⁻¹)	166.44 \pm 18.06	161.50 \pm 16.36	150.83 \pm 13.93	185.94 \pm 19.15	150.94 \pm 17.36	155.81 \pm 14.77	N.S.
ICAM-1 (ng mL ⁻¹)	49.96 \pm 13.80	55.04 \pm 14.96	57.29 \pm 16.20	74.85 \pm 15.12	67.85 \pm 16.39	77.55 \pm 17.75	N.S.

^a Values represent mean \pm standard error of mean. TNF- α : tumor necrosis factor- α ; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1. Statistical analysis: 2 \times 2 repeated measures factorial design examining effects of the dietary treatment, group and their interaction. *P*^{*} values correspond to the effect of the treatment. The effects of the group and treatment-group interaction were N.S. in all parameters.

contrast, ICAM-1 values in both groups were within the range of control subjects (39–79 ng mL⁻¹),³³ being higher in the hypercholesterolemic group compared to the normocholesterolemic. After the intervention stages, there was a decrease of VCAM-1 in both groups, without reaching the level of statistical significance (Table 4).

At the start of this study, subjects were normotensive (SBP < 140 mmHg and DBP \geq 80 mmHg) with the hypercholesterolemic group registering higher blood pressure values, though not significantly different from those of the normocholesterolemic group. The interventions did not induce any changes in these blood pressure values or heart rate (Table 5).

Antioxidant capacity (as measured by the ORAC, FRAP and ABTS methods) and levels of protein (carbonyl groups) and lipid (MDA) oxidation showed no significant differences after the interventions (Table 5). There were no changes either in any of the anthropometric parameters (Table 6) or in body density or percentage of body fat (data not shown). Likewise, there were no changes in energy expenditure values, which were 925 \pm 101, 835 \pm 153 and 848 \pm 100 kcal per day at baseline and for milk and cocoa interventions, respectively, in the normocholesterolemic group, and 622 \pm 245, 534 \pm 230 and 569 \pm 168 kcal per day at baseline and in milk and cocoa interventions, respectively, in the hypercholesterolemic group.

Table 5 Blood pressure, heart rate and oxidation and antioxidant biomarkers after a 2-week run-in stage (baseline), milk intervention (control, 4 weeks) and cocoa intervention (4 weeks)^a

	Normocholesterolemic (<i>n</i> = 24)			Hypercholesterolemic (<i>n</i> = 20)		
	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention
Blood pressure						
Systolic (mmHg)	116.29 \pm 2.27	114.73 \pm 2.37	117.02 \pm 2.45	120.60 \pm 2.49	120.21 \pm 2.59	121.43 \pm 2.68
Diastolic (mmHg)	72.12 \pm 1.79	72.00 \pm 1.67	73.33 \pm 1.87	76.40 \pm 1.96	77.00 \pm 1.83	78.20 \pm 2.05
Heart rate (bpm)	67.21 \pm 2.30	67.67 \pm 2.12	64.46 \pm 2.32	73.90 \pm 2.44	70.95 \pm 2.32	73.05 \pm 2.44
Oxidation and antioxidant biomarkers						
MDA (nmol mL ⁻¹)	2.34 \pm 0.13	2.31 \pm 0.13	2.24 \pm 0.15	2.47 \pm 0.14	2.51 \pm 0.14	2.33 \pm 0.17
CG (nmol g ⁻¹ protein)	0.36 \pm 0.05	0.34 \pm 0.05	0.33 \pm 0.05	0.35 \pm 0.05	0.29 \pm 0.05	0.38 \pm 0.06
FRAP (μ M TE)	571.81 \pm 34.59	552.00 \pm 17.90	550.12 \pm 21.40	568.45 \pm 23.41	558.35 \pm 24.44	556.15 \pm 18.41
ORAC (μ M TE)	16 193 \pm 389	16 087 \pm 292	16 624 \pm 365	15 150 \pm 647	15 365 \pm 756	14 822 \pm 919
ABTS (μ M TE)	3689 \pm 70	3597 \pm 49	3677 \pm 62	3696 \pm 76	3683 \pm 60	3653 \pm 67

^a Values represent mean \pm standard error of mean. MDA: malondialdehyde; CG: carbonyl groups; TE: Trolox equivalents; FRAP: ferric reducing/antioxidant power; ORAC: oxygen radical absorbance capacity; ABTS: free radical scavenging capacity. Statistical analysis: 2 \times 2 repeated measures factorial design examining effects of the dietary treatment, group and their interaction. The effects of the treatment, the group and treatment-group interaction were N.S. in all parameters.

Table 6 Mean \pm standard error of anthropometric parameters after a 2-week run-in stage (baseline), milk intervention (control, 4 weeks) and cocoa intervention (4 weeks)^a

	Normcholesterolemic ($n = 24$)			Hypercholesterolemic ($n = 20$)		
	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention	Baseline	Milk intervention	Cocoa intervention
Body weight (kg)	67.04 \pm 2.72	66.96 \pm 2.74	67.16 \pm 2.74	68.65 \pm 2.98	68.95 \pm 3.00	69.25 \pm 3.00
BMI (kg m ⁻²)	22.96 \pm 0.66	22.83 \pm 0.65	23.08 \pm 0.64	24.05 \pm 0.77	24.25 \pm 0.78	24.10 \pm 0.78
Skin folds						
Tricipital (mm)	18.29 \pm 1.33	17.75 \pm 1.38	17.20 \pm 1.37	21.35 \pm 1.46	19.95 \pm 1.52	20.00 \pm 1.50
Subscapular (mm)	13.00 \pm 1.05	12.33 \pm 1.06	12.46 \pm 1.07	16.20 \pm 1.20	16.00 \pm 1.40	16.20 \pm 1.41
Circumferences						
Waist (cm)	77.62 \pm 2.41	76.13 \pm 2.22	78.30 \pm 2.18	79.75 \pm 2.64	78.40 \pm 2.43	78.30 \pm 2.40
Abdominal (cm)	85.29 \pm 1.73	84.25 \pm 1.89	84.96 \pm 1.66	89.10 \pm 2.13	89.35 \pm 2.15	88.60 \pm 2.12
Hip (cm)	98.29 \pm 1.24	98.42 \pm 1.27	98.22 \pm 1.47	99.20 \pm 1.36	99.10 \pm 1.39	99.15 \pm 1.61
Thigh (cm)	53.71 \pm 1.33	53.00 \pm 0.90	53.33 \pm 0.85	53.95 \pm 1.46	53.75 \pm 0.98	53.65 \pm 0.92

^a Statistical analysis: 2×2 repeated measures factorial design examining effects of the dietary treatment, group and their interaction. The effects of the treatment, the group and treatment-group interaction were N.S. in all parameters.

Discussion

This study shows that regular consumption of a moderate amount of a flavanol-rich soluble cocoa product, providing 45.3 mg of flavanols per day, as part of a Spanish-Mediterranean diet, may protect against cardiovascular disease by increasing HDL-C levels without leading to anthropometric changes.

Soluble cocoa powder is widely consumed in many countries by different population groups.⁴ The daily amount of flavanols provided by the cocoa product here studied falls within the typical US daily intake of flavanols (20–100 mg).³⁴

This study was carried out with free-living subjects, and the only dietary modifications introduced were the consumption of a cocoa product in milk twice a day and restricting certain fruits and vegetables, as previously indicated. Consuming two cocoa beverages per day reproduces real conditions and the amount of cocoa tested may be considered moderate and realistic. Previous results from our team with another cocoa product showed that sustained consumption of a dietary fiber-rich cocoa powder twice a day, providing a similar amount of flavanols per day (44 mg) as the cocoa product used in the present study (45.3 mg), induced an increase in HDL-C and a decrease in fasting serum glucose, IL-1 β and IL-10, without producing any anthropometric changes.²³ Other studies dealing with the chronic effects of cocoa powder used high doses (40 g per day).^{35,36} Although the above results thus obtained might strongly affect different disease endpoints, the question remains as to whether such effects would be obtained under normal consumption patterns. To answer this question, a realistic approach was adopted in the design of our study, aimed at reproducing current consumption patterns within a healthy diet. The results would be representative of a moderate, habitual consumption of soluble cocoa products by healthy and moderately hypercholesterolemic population groups for whom high intakes of sugar and fat-rich chocolate would not be recommended, in spite of its high flavanol content.

In the present study design, blood samples were taken after an overnight fast before biochemical and biomarker analyses, which prevented the determination of flavanol metabolites in plasma, especially considering that the last cocoa serving would have been taken at least 16 h prior to blood sampling. However, in a previous bioavailability study carried out by our research team, volunteers consumed a single dose of a soluble cocoa product in milk providing 8.55 mg epicatechin and plasma epicatechin concentrations were up to 0.26 μ M, mainly as glucuronide and sulfate metabolites (unpublished results). Considering that the amount of epicatechin consumed by volunteers in the present study was 9.45 mg per serving, it is reasonable to expect similar postprandial plasma concentrations of epicatechin metabolites. Although both the cocoa and epicatechin doses used in the present study were low, and consequently the potential plasma levels of flavanol metabolites would also be low, the fact that there was a significant increase in HDL-C levels after a 4-week intervention suggests that cocoa might elicit cardioprotective effects even when moderately consumed within a normal diet.

Flavonoids may protect against cardiovascular disease (CVD) by inducing antioxidant, anti-platelet and anti-inflammatory effects, as well as by increasing HDL-C, lowering blood pressure and improving endothelial function.¹⁴ Of all these mechanisms, we observed that regularly consuming cocoa significantly increased HDL-C ($p = 0.001$) in agreement with previous studies in healthy subjects¹⁰ and patients with high risk of developing cardiovascular disease.^{10,35} According to Hooper *et al.*,³⁷ the effect of cocoa on HDL-C levels is greater in long-term trials; however, interestingly, we observed this effect after a moderate consumption of the cocoa product for four weeks. It has been suggested that the potential mechanism involved in producing this cocoa effect on HDL-C levels consists of an increase in the expression and secretion of apolipoprotein A1 (ApoA1), the major protein component of HDL-C.³⁸ Experiments carried out in a human hepatoma cell line (HepG2), as well as in human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco2 cells, treated with cocoa polyphenols support such a mechanism, showing that the

effect results from the up-regulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs), which are primarily responsible for the regulation of genes involved in cholesterol biosynthesis and metabolism.³⁸ In addition, catechin and cocoa liquor procyanidin significantly increased the scavenger receptor BI (SR-BI) mRNA expression in HepG2 (SR-BI is a cell surface receptor that mediates selective HDL uptake), and all cocoa polyphenols up-regulated ABCA1 mRNA expression compared with control cultures. ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) plays a role in cholesterol efflux with the ABCA1-apolipoprotein reaction being an important pathway in the release of cholesterol from cells and conversion into bile acid in the liver. In other *in vitro* experiments a flavone derivative compound also activated the ABCA1 promotor,³⁹ and when the flavone derivative was fed to hypercholesterolemic rats an increase in HDL-C levels was observed.³⁹ As cholesterol metabolism is regulated by several different mechanisms, it is possible that cocoa polyphenols may act on multiple pathways.³⁹ The cholesterol efflux capacity of HDL is a great contributor to the atheroprotective role of HDL as excess lipids are removed from the body, including atherosclerotic plaques. HDL acquires cellular lipids through interaction with ABCA1, ATP-binding cassette transport G 1, SR-BI and *via* aqueous diffusion.⁴⁰ Even so, contributions to the observed effect on HDL-C of other cocoa components such as dietary fiber⁴¹ and theobromine⁴² should not be disregarded, as well as the fact that the statistical power of this study was calculated taking total cholesterol as the main variable and not HDL-C which would have resulted in a larger sample size to obtain the same statistical power. Another point that should be considered when interpreting the present results is that free-living volunteers may slightly change their diet during the study. As volunteers fill in dietary records, they are more conscious and careful about their diet, so they may introduce modifications that improve their lipid profile with respect to baseline. This may explain the statistical increase in HDL-C levels in the control stage compared to the start of the study.

The absence of other significant cardiovascular protective effects may be attributable to the mixture of the cocoa powder with milk, which has been shown to inhibit flavonoid absorption,⁴³ although certain controversy exists with respect to this point.⁴⁴ In fact, our previously mentioned unpublished observations support the bioavailability of cocoa flavonoids from the soluble cocoa product in milk. On the other hand, the lack of any antioxidant effect should be expected, considering measurements were done in fasting blood samples where plasma cocoa polyphenols would not reach a high enough concentration. Moreover, circulating metabolites would not show the same antioxidant activity as the parent molecule, which is in line with Turner *et al.*⁴⁵ Accordingly, Ramirez-Sánchez *et al.*⁴⁶ attributed the effective reductions in skeletal muscle oxidative stress induced by low doses of epicatechin to the modulation of key regulatory systems, and not to a direct antioxidant effect.

Inflammation is recognized as an independent mechanism in the pathogenesis of atherosclerosis. As various inflammatory markers have been shown to predict the risk of future CVD

events, one of the aims of this study was to determine such biomarkers. However, no significant changes in the pro-inflammatory cytokines were observed after cocoa consumption, which is in agreement with previous studies in humans,¹² but contrasts with the anti-inflammatory cocoa effects described *in vitro* via a TNF- α and IL-1 β decrease.⁴⁷ Surprisingly, IL-10, which is involved in the inflammatory response by down-regulating the synthesis of other pro-inflammatory cytokines,⁴⁸ including IL-1 β ,⁴⁹ significantly decreased after the cocoa intervention in both groups, compared to baseline and the milk intervention. Similar to most cytokines, soluble adhesion molecules did not show significant changes, although VCAM-1 levels were lower (not statistically) after the cocoa intervention. This tendency was also observed in a study carried out in hypercholesterolemic postmenopausal women when a high-flavanol cocoa beverage was consumed (446 mg flavanols) for 6 weeks, but not with a low-flavanol cocoa (43 mg flavanols).¹⁷

Regarding the blood pressure lowering effect of cocoa, which has been attributed to flavanols increasing vascular nitric oxide synthase activity,^{50,51} it was observed that there were greater effects when the epicatechin subgrouping dose was >50 mg per day.³⁷ In this study the cocoa product provided 18.9 mg per day of epicatechin and did not induce any hypotensive effects in normocholesterolemic or hypercholesterolemic subjects that were normotensive at baseline. Accordingly, significant reductions in blood pressure have been described in hypertensive subjects rather than in normotensive individuals.⁵²

This work presents certain limitations: the lack of blinding of subjects and investigators may have induced a certain bias; the number of subjects was relatively small; treatment duration was limited and perhaps too short to predict the effects of habitual cocoa intake on the cardiovascular and anthropometric parameters studied. It is not possible to assess individually to what extent dietary fiber, polyphenols or other ingredients in the cocoa product contributed to the observed effects. Free-living volunteers may introduce changes in their diet during the study.

Conclusion

This study has shown that regular consumption of a flavanol-rich soluble cocoa product in milk improves HDL-C levels in both normocholesterolemic and hypercholesterolemic subjects. Moreover, no adverse effects were observed on anthropometric parameters, especially body weight. Although the effects produced in this study were modest, they were obtained by testing moderate, realistic cocoa doses as a part of a Spanish-Mediterranean diet in free-living subjects.

Acknowledgements

This study was funded by Nutrexpa S.L. We wish to thank the volunteers who participated in this study, Laura Barrios for her statistical assistance, Aránzazu Fernández-Espinoza for her technical assistance and Roland V. Chiverton for revising the English language editing. We also wish to acknowledge the Consolider-Ingenio Project (CSD2007-00063) from the Spanish

Ministry of Science and Innovation and S.M.-L. who is a predoctoral fellow of the JAE Program funded by CSIC and the European Social Fund. L.B. conceived and designed the study. B.S., S.M.-L., R.M., J.L.S.-C. and L.G. generated, collected, assembled, analyzed and together with L.B. and B.S. interpreted data. B.S. drafted the manuscript. All the authors revised and approved the final version of the manuscript. The authors declare no conflicts of interest.

References

- 1 K. W. Lee, Y. J. Kim, H. J. Lee and C. Y. Lee, Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 7292–7295.
- 2 C. Selmi, C. A. Cocchi, M. Lanfredini, C. L. Keen and M. E. Gershwin, Chocolate at heart: The anti-inflammatory impact of cocoa flavonoids, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2008, **52**, 1340–1348.
- 3 E. Roura, C. Andrés-Lacueva, R. Estruch, M. L. Mata-Bilbao, M. Izquierdo-Pulido, A. L. Waterhouse and R. M. Lamuela-Raventós, Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human, *Ann. Nutr. Metab.*, 2007, **51**, 493–498.
- 4 K. A. Cooper, J. L. Donovan, A. L. Waterhouse and G. Williamson, Cocoa and health: a decade of research, *Br. J. Nutr.*, 2008, **99**, 1–11.
- 5 F. Visioli, H. Bernaert, R. Corti, C. Ferri, S. Heptinstall, E. Molinari, A. Poli, M. Serafini, H. J. Smit, J. A. Vinson, F. Violi and R. Paoletti, Chocolate, lifestyle, and health, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2009, **49**, 299–312.
- 6 V. Fogliano, M. L. Corollaro, P. Vitaglione, A. Napolitano, R. Ferracane, F. Travaglia, M. Arlorio, A. Costabile, A. Klinder and G. Gibson, In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, **55**, S44–S55.
- 7 F. Hermann, L. E. Spieker, F. Ruschitzka, I. Sudano, M. Hermann, C. Binggeli, T. F. Lüscher, W. Riesen, G. Noll and R. Corti, Dark chocolate improves endothelial and platelet function, *Heart*, 2006, **92**, 119–120.
- 8 A. J. Flammer, F. Hermann, I. Sudano, L. Spieker, M. Hermann, K. A. Cooper, M. Serafini, T. F. Lüscher, F. Ruschitzka, G. Noll and R. Corti, Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity, *Circulation*, 2007, **116**, 2376–2382.
- 9 B. Sarriá, R. Mateos, J. L. Sierra-Cinos, L. Goya, L. García-Diz and L. Bravo, Hypotensive, hypoglycaemic and antioxidant effects of consuming a cocoa product in moderately hypercholesterolemic humans, *Food Funct.*, 2012, **3**, 867–874.
- 10 S. Baba, M. Natsume, A. Yasuda, Y. Nakamura, T. Tamura, N. Osakabe, M. Kanegae and K. Kondo, Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder, *J. Nutr.*, 2007, **137**, 1436–1441.
- 11 J. Mursu, S. Voutilainen, T. Nurmi, T. H. Rissanen, J. K. Virtanen, J. Kaikkonen, K. Nyyssönen and J. T. Salonen, Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans, *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, **37**, 1351–1359.
- 12 S. Mathur, S. Devaraj, S. M. Grundy and I. Jialal, Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 3663–3667.
- 13 European Food Safety Agency, Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to cocoa flavanols and protection of lipids from oxidative damage (ID 652, 1372, 1506, 3143), and maintenance of normal blood pressure (ID 1507) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, *EFSA J.*, 2010, **8**, 21.
- 14 S. Arranz, P. Valderas-Martinez, G. Chiva-Blanch, R. Cadas, M. Urpi-Sarda, R. Lamuela-Raventós and R. Estruch, Cardioprotective effects of cocoa: clinical evidence from randomized clinical intervention trials in humans, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2013, **57**, 936–947.
- 15 European Food Safety Agency, Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation pursuant to article 13(5) of regulation (EC) No 1924/2006, *EFSA J.*, 2012, **10**, 21.
- 16 R. Di Giuseppe, A. D. Castelnuovo, F. Centritto, F. Zito, A. De Curtis, S. Costanzo, B. Vohnout, S. Sieri, V. Krogh, M. B. Donati, G. de Gaetano and L. Iacoviello, Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in healthy Italian population, *J. Nutr.*, 2008, **138**, 1939–1945.
- 17 J. F. Wang-Polagruto, A. C. Villablanca, J. A. Polagruto, L. Lee, R. R. Holt, H. R. Schrader, J. L. Ensuna, F. M. Steinberg, H. H. Schmitz and C. L. Keen, Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2006, **47**(Supplement 2), S177–S186.
- 18 L. M. Ostertag, N. O’Kennedy, P. A. Kroon, G. G. Duthie and B. de Roos, Impact of dietary polyphenols on human platelet function - A critical review of controlled dietary intervention studies, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2010, **54**, 60–81.
- 19 N. Matsui, R. Ito, E. Nishimura, M. Kato, M. Kamei, H. Shibata, M. Kamei, H. Shibata, I. Matsumoto, K. Abe and S. Hashizume, Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism, *Nutrition*, 2005, **21**, 594–601.
- 20 O. Moreiras, A. Carbajal, L. Cabrera and C. Cuadrado, in *Tablas de composición de alimentos*, ed. Pirámide, 13th edn, 2009.
- 21 L. Bravo and F. Saura-Calixto, Characterization of the dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1998, **49**, 135–141.
- 22 E. Cienfuegos-Jovellanos, M. M. Quiñones, B. Muguerza, L. Moulay, M. Miguel and A. Aleixandre, Antihypertensive

- effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 6156–6162.
- 23 B. Sarriá, S. Martínez-López, J. L. Sierra-Cinos, L. García-Diz, R. Mateos and L. Bravo, Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults, *Br. J. Nutr.*, 2013, **4**, 1–13.
 - 24 R. Pulido, L. Bravo and F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 3396–3402.
 - 25 R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231–1237.
 - 26 D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill and R. L. Prior, High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 4437–4444.
 - 27 R. Mateos, E. Lecumberri, S. Ramos, L. Goya and L. Bravo, Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2005, **827**, 76–82.
 - 28 S. Richert, N. B. Wehr, E. R. Stadtman and R. L. Levine, Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, **397**, 430–432.
 - 29 W. E. Siri, Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods, in *Techniques for measuring body composition*, ed. J. Brozek and A. Henschel, National Academy of Sciences, Natural Resources Council Washington DC, 1961, pp. 223–244.
 - 30 J. V. G. A. Durnin and J. Womersley, Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years, *Br. J. Nutr.*, 1974, **32**, 77–97.
 - 31 M. A. Martínez-González, C. López-Fontana, J. J. Varo, A. Sánchez-Villegas and J. A. Martínez, Validation of the Spanish version of the physical activity questionnaire used in the Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study, *Public Health Nutr.*, 2005, **8**, 920–927.
 - 32 A. N. Kassis, S. Santosa and P. J. H. Jones, Potential health claims on dietary fiber: How robust is the evidence?, *Int. J. Nutr. Metab.*, 2010, **4**, 28–32.
 - 33 H. Kokkenn, I. Söderstrom, J. Rocklöv, G. Hallmans, K. Lejon and S. Rantapää Dahlqvist, Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.*, 2010, **62**, 383–391.
 - 34 O. A. Tokade, J. M. Gaziano and L. Djoussé, Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2011, **65**, 879–886.
 - 35 N. Khan, M. Monagas, C. Andres-Lacueva, R. Casas, M. Urpí-Sardà, R. M. Lamuela-Raventós and R. Estruch, Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease, *Nutr., Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2012, **22**, 1046–1053.
 - 36 M. Monagas, N. Khan, C. Andres-Lacueva, R. Casas, M. Urpí-Sardà, R. Llorach, R. M. Lamuela-Raventós and R. Estruch, Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, **90**, 1144–1150.
 - 37 L. Hooper, P. A. Kroon, E. B. Rimm, J. S. Cohn, I. Harvey, K. A. Le Cornu, J. J. Ryder, W. L. Hall and A. Cassidy, Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, **88**, 38–50.
 - 38 A. Yasuda, M. Natsume, N. Osakabe, K. Kawahata and J. Koga, Cocoa polyphenols influence the regulation of apolipoprotein in HepG2 and Caco2 cells, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 1470–1476.
 - 39 L. Guo, W. R. Hu, J. H. Lian, W. Ji, T. Deng, M. Qian and B. Q. Gong, Anti-hyperlipidemic properties of CM108 (a flavone derivative) in vitro and in vivo, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, **551**, 80–86.
 - 40 C. J. Andersen and M. L. Fernández, Dietary approaches to improving atheroprotective HDL functions, *Food Funct.*, 2013, **4**(9), 1304–1313.
 - 41 H. Wu, K. M. Dwyer, Z. Fan, A. Shircore, J. Fan and J. H. Dwyer, Dietary fiber and progression of atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, **78**, 1085–1091.
 - 42 N. Neufingerl, Y. E. M. P. Zebregs, E. Schuring and E. A. Trautwein, Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2013, **97**, 1201–1209.
 - 43 J. B. Keogh, J. McInerney and P. M. Clifton, The effect of milk protein on the bioavailability of cocoa polyphenols, *J. Food Sci.*, 2007, **72**(3), S230–S233.
 - 44 E. Roura, C. Andrés-Lacueva, R. Estruch, M. L. Mata-Bilbao, M. Izquierdo-Pulido, A. L. Waterhouse and R. M. Lamuela-Raventós, Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human, *Ann. Nutr. Metab.*, 2007, **51**, 493–498.
 - 45 R. Turner, T. Baron, S. Wolfram, A. Cassidy, G. Rimbach and P. D. Weinberg, Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein, *Free Radical Res.*, 2004, **38**, 209–216.
 - 46 I. Ramirez-Sánchez, P. R. Taub, T. P. Ciaraldi, L. Nogueira, T. Coe, G. Perkins, M. Hogan, A. S. Maisel, R. R. Henry, G. Ceballos and F. Villarreal, (–)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients, *Int. J. Cardiol.*, 2013, **168**(4), 3982–3990.
 - 47 E. Ramiro, A. Franch, C. Castellote, F. Pérez-Cano, J. Permanyer, M. Izquierdo-Pulido and M. Castell, Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate

- inflammatory mediators, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**(22), 8506–8511.
- 48 M. Heiskanena, M. Kähönen, M. Hurme, T. Lehtimäki, N. Mononen, M. Juonala, N. Hutri-Kähönen, J. Viikari, O. Raitakari and J. Hukkonen, Polymorphism in the IL10 Promoter Region and Early Markers of Atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, *Atherosclerosis*, 2010, **208**, 190–196.
- 49 T. K. Mao, J. J. Powell, J. van de Water, C. L. Keen, H. H. Schmitz, J. F. Hammerstone and M. E. Gershwin, The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1- β in peripheral blood mononuclear cells, *Life Sci.*, 2000, **66**, 1377–1386.
- 50 N. D. L. Fisher, M. Hieghes, M. Gerhard-Herman and N. K. Hollenberg, Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilatation in healthy humans, *J. Hypertens.*, 2003, **21**, 2281–2286.
- 51 M. Galleano, I. Bernatova, A. Puzserova, P. Balis, N. Sestakova, O. Pechanova and C. G. Fraga, (-)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism, *IUBMB Life*, 2013, **65**(8), 710–715.
- 52 K. Ried, T. Sullivan, P. Fakler, O. R. Frank and N. P. Stocks, Does chocolate reduce blood pressure? A meta-analysis, *BMC Med.*, 2010, **8**, 39–49.

Artículo 5.

Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans.

Beatriz Sarriá, Sara Martínez-López, José Luis Sierra-Cinos, Luis García-Diz, Luis Goya, Raquel Mateos, Laura Bravo

Food Chemistry (en evaluación)

Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans

Beatriz Sarriá^{1*}, Sara Martínez-López¹, José Luis Sierra-Cinos², Luis García-Diz², Luis Goya¹, Raquel Mateos¹, Laura Bravo¹

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC). Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Novais, 10, 28040, Madrid, Spain.

²Department of Nutrition and Bromatology I. School of Pharmacy. Complutense University of Madrid (UCM). Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid, Spain.

*Corresponding author: Beatriz Sarriá

Address: Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain.

Tel: +34915492300. FAX: +34915493627,

Email: beasarria@ictan.csic.es

Abstract

Cocoa manufacturers are producing novel products increasing polyphenols, methylxanthines or dietary fibre to improve cocoa's health effects. We attempt to explain the contribution of these bioactive compounds in cocoa products to the cardiovascular effects observed in previous studies, placing special interest on methylxanthines. We focused on a soluble cocoa product rich in dietary fibre (DFCP) and a product rich in polyphenols (PPCP). Effects of regularly consuming DFCP, daily providing 10.17g, 43.80mg and 168.60mg of total-dietary-fibre, flavanols and methylxanthines, respectively, as well as PPCP, daily providing 3.74g, 45.30mg and 109.80mg of total-dietary-fibre, flavanols and methylxanthines, respectively, on cardiovascular health were assessed in two controlled, crossover studies in free-living healthy and moderately hypercholesterolemic subjects. Both products increased HDL-cholesterol concentrations, whereas only DFCP decreased glucose, IL-1 β and IL-10 levels in all subjects. Flavanols seem responsible for the HDL-cholesterol increase, whereas insoluble-dietary-fibre and theobromine in DFCP for the hypoglycemic and inflammation effects obtained after consuming the fibre-rich-product.

Keywords: Soluble cocoa products, dietary fibre, polyphenols, methylxanthines, cardiovascular health, hypoglycemic, inflammation

1. Introduction

In recent years drastic changes are taking place in dietary habits in Mediterranean populations and a marked increase in cardiovascular disease mortality is occurring (Gómez-Huelgas et al., 2011). In Spain the consumption of meat, fish, fruit and dairy products has increased at the expense of consuming less vegetables, cereals and legumes (Carbajal, 2013). In contrast, cocoa remains to be a popular foodstuff worldwide. Soluble cocoa products have been popular in Spain, among other countries, being usually consumed twice a day, at breakfast and as part of an evening break known as 'merienda'. Cocoa is an important source of flavonoids, mainly flavanols: epicatechin and catechin and low molecular weight procyanidins such as procyanidin B1 and B2; in addition, it contains methylxanthines, mainly theobromine, and magnesium which are biologically active substances that may also affect human health (Ellam & Williamson, 2013). Cocoa is also a relevant source of dietary fibre in contrast to chocolate (Sarriá, et al., 2012).

The cardioprotective effects of cocoa are well established as several comprehensive reviews recently published show (Arranz et al., 2013; Ellam & Williamson, 2013). In an attempt to improve the product's potential health properties, cocoa manufacturers are producing new functional cocoa products with reduced energy (fat and sugar content) and enriched in bioactive components. Recently, we have shown that two soluble cocoa products rich in

flavanols and in dietary fibre increased serum HDL-cholesterol concentrations in healthy and moderately hypercholesterolemic (200-240 mg/dL) subjects, the dietary fibre rich product also decreasing glucose, IL-1 β and IL-10 levels in both groups (Sarriá, et al., 2014; Martínez-López, et al., 2014). This work elaborates on the relative contribution of the bioactive compounds, namely flavonoids, dietary fibre (DF) and methylxanthines, in soluble cocoa products to the observed health beneficial effects.

2. Material and methods

The commercialized soluble cocoa products used in the studies were provided by Nutrexpa S.L. Cocoa extracts were obtained as described previously (Bravo, & Saura-Calixto, 1998) and polyphenolic and methylxanthine composition was characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection (DAD) using an Agilent 1200 series equipment (Martin et al., 2008). Quantification was done by comparison with known standards (epicatechin, procyanidin B2, theobromine and caffeine). Total polyphenols were measured spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent and gallic acid as standard. Total dietary fibre analysis was carried out following the same procedure described in Sarriá, et al. (2014). The total polyphenol, flavanol, dietary fibre and methylxanthine composition of the soluble cocoa product rich

in dietary fibre (DFCP) and the soluble cocoa product rich in polyphenols (PPCP) is shown in Table 1.

Two controlled, crossover, studies were carried out in free-living healthy and moderately hypercholesterolemic (200-240 mg/dL) subjects to assess the effects on cardiovascular health of regularly consuming realistic doses of DFCP (Sarriá, et al., 2014) and PPCP (Martínez-López, et al., 2014). The doses of cocoa consumed in both human intervention studies were realistic and corresponded to habitual consumption patterns as recommended by the manufacturer: 15 g per serving of the DFCP, twice a day (30 g/day) and half that amount of PPCP, 7.5 per serving of PPCP twice per day (15 g/d) since this product had a strong cocoa flavour. For the duration of the studies (two-week run-in, four-week milk stage (control), and four-week cocoa intervention in each study), other cocoa products, certain fruits and vegetables rich in polyphenols, as well as their derived beverages, were completely restricted to reduce interindividual differences in polyphenol intake and to be able to attribute the results observed, for the most part, to the consumption of the cocoa product for 4 weeks. The daily consumption of flavanols, dietary fibre and methylxanthines provided by DFCP and PPCP is shown in Table 2.

3. Results and discussion

The most significant finding observed after consuming either DFCP or PPCP was the increase in HDL-cholesterol (HDL-C, $p < 0.001$, Figure 1). This increment was higher in the normocholesterolemic subjects in both interventions (77 and 91 mg/L with DFCP and PPCP, respectively, compared to baseline) than in the dyslipemic patients (51 and 60 mg/L with DFCP and PPCP, respectively), although not statically different.

Up to date, a body of scientific evidence points to polyphenols as the main compounds responsible for cocoa's beneficial cardiovascular effects (Baba et al., 2007; Hooper et al., 2008; Shrive, et al., 2011; Khan et al., 2012; Arranz et al., 2013; Ellam & Williamson, 2013). DFCP and PPCP provided similar daily amounts of cocoa flavanols (Table 2) since the flavanol concentration in the PPCP was twice that of the DFCP, but the amount of cocoa daily consumed was half that in the PPCP intervention; in consequence the daily consumption of flavanols was 45.3 mg and 43.8 mg with PPCP and DFCP, respectively, and thus the contribution of the phenolic compounds to the cardiovascular effects observed in both studies would be similar. Interestingly, within the flavanol composition of the cocoa products, DFCP contained a lower amount of epicatechin than PPCP (0.31 vs. 1.26 mg/g, respectively); on the contrary, the content of catechin was higher in DFCP than in PPCP (0.60 vs. 0.47 mg/g, respectively). Probably the processing involved in the manufacture of the products is responsible for this

difference, as roasting is as a crucial step in technical treatment of cocoa, which leads to flavanol losses and modifications, especially the epimerization of (-)-epicatechin to (-)-catechin (Kothe, Zimmermann, & Galensa, 2013).

As for the dietary fibre intake, during the DFCP intervention subjects consumed over 10 g cocoa DF/d in comparison with less than 4 g/d in the PPCP (Table 2). This large difference in DF intake should have resulted in distinctive HDL-cholesterol values in each intervention would have DF had a direct effect on HDL metabolism. Although Jenkins et al. (2000) reported a significant increase in HDL-cholesterol after consumption for two weeks of a cocoa-bran (25 g DF/d) in healthy subjects, they failed to analyse the polyphenolic content of the cocoa-bran. Similarly, in a previous non-controlled, non-randomized, two-month-long, open intervention trial in free-living, moderately hypercholesterolemic volunteers who daily consumed two servings of a fibre rich cocoa product, which provided a slightly higher amount of total DF (12g/d DF) than in the study using DFCP and 30% less soluble polyphenols (283 mg/d of polyphenols), we observed that HDL-cholesterol was also slightly increased (19 mg/L) after 8 weeks compared with baseline values (Sarriá, et al., 2012). Again, the higher fibre intake in this study rules out a direct effect increasing HDL-cholesterol.

Recently, Neufingerl, Zebregs, Schuring & Trautwein (2013) found that theobromine independently increased HDL-cholesterol in a two-center, double-blind, randomized, placebo-controlled, full factorial parallel design in healthy

subjects, suggesting that this methylxanthine was responsible for the HDL-cholesterol raising effect of cocoa. In our studies, DFCP resulted in a 60% higher daily theobromine intake as compared with PPCP (Table 2). However, HDL-cholesterol increase, compared to baseline values, was 13 and 9% in the normo- and hypercholesterolemic subjects, respectively, after consuming the DFCP for four weeks, and up to 16% and 12% in the healthy and dyslipemic volunteers, respectively, after the PPCP. Again, these results do not suggest a major contribution of theobromine on HDL-cholesterol, although this subject requires further study.

From the cardiovascular perspective, the present results point to cocoa flavonoids as responsible for the HDL-cholesterol enhancing effect, with isomers epicatechin and catechin having similar biological activity. Flavanols would exert this effect by different mechanisms, such as increased expression of scavenger receptor B type I (SR-BI), sterol regulatory element binding proteins (SREBPs), ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) or apolipoprotein A1, among others (Martínez-López, et al., 2014).

The second most relevant effect was the decrease in glucose ($p=0.029$) levels observed after regularly consuming DFCP, but not after consuming PPCP (Figure 2). This result is in agreement with the significant decrease in plasma glucose concentration ($p=0.019$) observed in a previous study with a dietary fibre-rich cocoa product (Sarriá, et al., 2012). Polyphenol-rich cocoa products

have shown to reduce fasting and postprandial blood glucose and insulin resistance (Almoosawi, Tsang, Ostertag, Fyfe, & Al-Dujali, 2012; Grassi, Lippi, Necozone, Desideri, & Ferri, 2005a & 2005b). However, the similar polyphenol intake during both interventions does not support the different response on fasting glucose levels in the DFCP vs. PPCP interventions. The decreased plasma glucose concentration when dietary fibre-rich soluble cocoa powders were consumed point to a prominent effect of DF on these outcomes, since it is well known the effect of dietary fibre rich foods delaying glucose absorption from the small intestine (Giacco et al., 2000) and improving insulin sensitivity (Tokede, Gaziano, & Djoussé, 2011).

Possibly, methylxanthines in DFCP, particularly theobromine, and to a lesser extent caffeine, have played a role in the glucose decrease in agreement with Kelly (2005), as methylxanthines inhibit phosphodiesterase and thereby increase the intracellular concentration of cyclic AMP (cAMP) in pancreatic cells, antagonizing P1 purine receptors (Bruinsma, & Taren, 1999). In contrast, methylxanthines are negatively coupled to adenylate cyclase in hepatocytes and induce a decrement in cAMP concentration in these cells (Doyle, & Egan, 2003). Because both insulin secretion from pancreatic cells and liver glucose output are directly dependent on the intracellular concentration of cAMP, it is reasonable to speculate that methylxanthines may positively influence glucose metabolism in humans (Grassi, Lippi, Necozone, Desideri, & Ferri, 2005a).

The third most relevant outcome observed after regularly consuming DFCP, in contrast to PPCP, was the decrease in IL-1 β levels ($p=0.001$; Figure 3). Again, the similar intake of cocoa flavonoids in both interventions would not support a direct effect of polyphenols on this outcome. There are evidences supporting an anti-inflammatory effect of cocoa polyphenols decreasing serum C-reactive protein (CRP) levels, as well as different cytokines (IL-2, IL-5, TNF- α , TGF- β), although a lack of effect has also been reported (revised in Arranz et al., 2013; Ellam & Williamson, 2013). The use of different cocoa products with different phenolic composition in distinct population groups (healthy, obese, dyslipemic, diabetic, etc.) would account for these contradictory findings.

In the present work, the clear effect of DFCP decreasing IL-1 β levels is in agreement with previous studies that show that a high-fibre diet is associated with lower plasma levels of other pro-inflammatory cytokines, IL-6, and TNF-R2, in the absence of an association between dietary fibre and CRP (Ma et al., 2008). In contrast, recently whole grain intake has been associated with lower concentrations of CRP in epidemiological and intervention studies (Jonnalagadda, et al., 2011). In fact, epidemiologic studies show that cereal fibre, a marker of whole-grain intake, and principally insoluble dietary fibre, offer protection from CVD and diabetes (Du et al., 2010). To our knowledge there is no other study that associates the intake of insoluble dietary fibre with the decrease in IL-1 β ; however, there are studies that show an association between insoluble dietary

fibre intake and other pro-inflammatory molecules; Qi, et al., (2006) observed that high whole grain intake was associated with lower CRP and TNF- α levels among women with type 2 diabetes, and other authors described an inverse association between whole grain intake and CRP concentrations (Lutsey et al., 2007; Jensen, et al., 2006). Accordingly, Katcher et al. (2008) observed a 38% reduction in CRP concentrations among obese individuals consuming a whole grain hypocaloric diet compared with a refined grain hypocaloric diet. These effects of whole grains have been attributed to the synergistic, antiinflammatory effects of dietary fibre, minerals, antioxidants, polyphenols, and other phytonutrients present in whole grain. Separately, although the knowledge on the effects methylxanthines on inflammation is scarce, these compounds have shown to reduce allergic inflammation (Tilley, 2011), thus perhaps the higher theobromine content in DFCP participated in the observed IL-1 β reduction. However, the effects of DFCP on inflammation are not clear and should be further investigated as also a decrease in anti-inflammatory cytokine IL-10 was observed.

4. Conclusions

Among the bioactive constituents in the two functional cocoa products, flavanols seems responsible for the HDL-cholesterol increase observed after consuming either the dietary fibre and the flavanol rich cocoa product, whereas the insoluble dietary fibre and theobromine in the fibre rich product seem

responsible for the hypoglycemic and anti-inflammatory effects observed after consuming only the fibre rich product, although the effects on inflammation need to be further clarified.

5. Acknowledgements

This study was funded by Nutrexpa S.L. We thank Project Consolider-Ingenio (CSD2007-00063) from the Spanish Ministry of Science and Innovation is also acknowledged. S.M.-L. thanks the Spanish National Research Council for her predoctoral fellowship under the JAE-Pre programme funded by the European Social Fund.

References

- Almoosawi, S., Tsang, C., Ostertag, L. M., Fyfe, L., & Al-Dujaili, E. A. S. (2012). Differential effect of polyphenol-rich dark chocolate on biomarkers of glucose metabolism and cardiovascular risk factors in healthy, overweight and obese subjects: a randomized clinical trial. *Food and Function*, 3, 1035-1043.
- Arranz, S., Valderas-Martinez, P., Chiva-Blanch, G., Casas, R., Urpi-Sarda, M., Lamuela-Raventos, R.M., & Estruch, R. (2013). Cardioprotective effects of cocoa: clinical evidence from randomized clinical intervention trials in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, 936-947.
- Baba, S., Natsume, M., Yasuda, A., Nakamura, Y., Tamura, T., Osakabe, M., Kanegae, M., & Kondo, K. (2007). Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *Journal of Nutrition*, 137, 1436-1441.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of the dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 135-141.
- Bruinsma, K., & Taren, D.L. (1999). Chocolate: food or drug?. *Journal of the American Dietetic Association*, 99, 1249-1256.

Carbajal, Á. (2013). <https://www.ucm.es/innovadieta/encuestas>

Doyle, M.E., & Egan, J.M. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacological Reviews*, 55, 105–131.

Du, H., van der A, D.L., Boshuizen, H.C., Forouhi, N.G., Wareham, N.J., Halkjær, J., Tjønneland, A., Overvad, K., Jakobsen, M.U., Boeing, H., Buijsse, B., Masala, G., Palli, D., Sørensen, T.I., Saris, W.H., & Feskens, E.J. (2010). Dietary fiber and subsequent changes in body weight and waist circumference in European men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 329–336.

Ellam, S., & Williamson, G. (2013). Cocoa and human health. *Annual Review of Nutrition*, 33, 105–128.

Giacco R., Parillo M., Rivellese A. A., Lasorella G., Giaco A., D’Episcopo L. & Ricardi, J. (2000). Long-term dietary treatment with increased amounts of fiber-rich low-glycemic index natural foods improves blood glucose control and reduces the number of hypoglycaemic events in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*, 23, 1461–1466.

Gomez-Huelgas, R., Mancera-Romero, J., Bernal-Lopez, M.R., Jansen-Chaparro, S., Baca-Osorio, A.J., Toledo, E., Perez-Gonzalez, R., Guijarro-Merino, R., Tinahones, F.J., Martinez-Gonzalez, M.A. (2011). Prevalence of

cardiovascular risk factors in an urban adult population from southern Spain. IMAP Study. *International Journal of Clinical Practice*, 65(1), 35-40.

Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G., & Ferri, C. (2005a). Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 611-614.

Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G., & Ferri, C. (2005b). Letters to the Editor. Reply to CJ Kelly. Effects of theobromine should be considered in future studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 483–489.

Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., & Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 38-50.

Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Vuksan, V., Vidgen, E., Wong, E., Augustin, L. S. A., & Fulgoni, V. (2000). Effect of cocoa bran on low-density lipoprotein oxidation and fecal bulking. *Archives of Internal Medicine*, 160, 2374-2379.

Jensen, M.K., Koh-Banerjee, P., Franz, M., Sampson, L., Gronbaek, M., & Rimm, E.B. (2006). Whole grains, bran, and germ in relation to homocysteine

and markers of glycemic control, lipids, and inflammation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 275–283.

Jonnalagadda, S.S., Harnack, L., Liu, R.H., McKeown, N., Seal, C., Liu, S., & Fahey, G.C. (2011). Putting the whole grain puzzle together: health benefits associated with whole grains—Summary of American Society for Nutrition 2010 Satellite Symposium. *Journal of Nutrition*, 141, 1011S–1022S.

Katcher, H.I., Legro, R.S., Kunesman, A.R., Gillies, P.J., Demers, L.M., Bagshaw, D.M., & Kris-Etherton, P.M. (2008). The effects of a whole grain-enriched hypocaloric diet on cardiovascular disease risk factors in men and women with metabolic syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 79–90.

Kelly, C.J. (2005). Effects of theobromine should be considered in future studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 483–489.

Khan, N., Monagas, M., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Lamuela-Raventós R.M., & Estruch, R. (2012). Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease*, 22, 1046–1053.

- Kothe, L., Zimmermann, B.F., & Galensa, R. (2013). Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. *Food Chemistry*, 141(4), 3656-3663.
- Lutsey, P.L., Jacobs, D.R., Kori, S., Mayer-Davis, E., Shea, S., Steffen, L.M., Szklo, M., & Tracy, R. (2007). Whole grain intake and its cross-sectional association with obesity, insulin resistance, inflammation, diabetes and subclinical CVD: The MESA Study. *British Journal of Nutrition*, 98, 397–405.
- Ma, Y., Hebert, J.R., Li, W., Bertone-Johnson, E.R., Olendzki, B., Pagoto S.L., Tinker, L., Rosal, M.C., Ockene, I.S., Ockene, J.K., Griffith, J.A., & Liu, S. (2008). Association between dietary fiber and markers of systemic inflammation in the Women’s Health Initiative Observational Study. *Nutrition*, 24, 941-949.
- Martin, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Granado, A. B., Izquierdo-Pulido, M. Bravo, L., & Goya, L. (2008). Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7765-7772.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Sierra-Cinos, J.L., Goya, L., Mateos, R., & Bravo, L. (2014). Realistic intake of a flavanol-rich soluble cocoa product increases

HDL-cholesterol without inducing anthropometric changes in healthy and moderately hypercholesterolemic subjects. *Food & Function*, 5, 364-374.

Neufingerl, N., Zebregs, Y.E.M.P., Schuring, E.A.H., & Trautwein, E.A. (2013).

Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 1201–1209.

Qi, L., Van Dam, R.M., Liu, S., Franz, M., Mantzoros, C., & Hu F.B. (2006).

Wholegrain, bran, and cereal fiber intakes and markers of systemic inflammation in diabetic women. *Diabetes Care*, 29, 207–11.

Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J.L., García-Diz, L., Mateos, R., &

Bravo, L. (2014). Regular consumption of a cocoa product improves the cardio-metabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolemic adults. *British Journal of Nutrition*, 111, 122-134.

Sarriá, B., Mateos, R., Sierra-Cinos, J.L., Goya, L., García-Diz, L., & Bravo, L. (2012).

Hypotensive, hypoglycaemic and antioxidant effects of consuming a cocoa product in moderately hypercholesterolemic humans. *Food & Function*, 3, 867.

Shrime, M. G., Bauer, S. R., McDonald, A. C., Chowdhury, N. H., Coltart, C. E. M.,

& Ding, E. L. (2011). Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple

cardiovascular risk factors in a meta-analysis of short-term studies.

Journal of Nutrition, 141, 1982-1988.

Tilley, S.L. (2011). Methylxanthines in Asthma. In B.B. Fredholm (ed.) *Handbook of Experimental Pharmacology* 200 (pp. 439-456). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Tokede, O.A., Gaziano J.M. & Djoussé L. (2011). Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65, 879-886.

Table 1. Flavanol, dietary fibre and methylxanthine composition of the cocoa product rich in dietary fibre (DFCP) and the product rich in flavanols (PPCP)

	DFCP	PPCP
Total Polyphenols		
(mg equiv gallic acid /g product)	15.75 ± 0.67	34.04 ± 2.28
Total flavanols (mg/g dry matter)	1.46 ± 0.32	3.02 ± 0.35
Epicatechin (mg/g dry matter)	0.31 ± 0.09	1.26 ± 0.18
Catechin (mg/g dry matter)	0.60 ± 0.12	0.47 ± 0.03
Procyanidin B1 (mg/g dry matter)	n.d.	0.20 ± 0.04
Procyanidin B2 (mg/g dry matter)	0.55 ± 0.11	1.09 ± 0.10
Total dietary fibre (%)	33.90 ± 1.80	24.90 ± 1.64
Soluble dietary fibre (%)	1.68 ± 0.13	3.13 ± 0.59
Neutral sugars (%)	0.69 ± 0.04	2.46 ± 0.43
Uronic acid (%)	0.99 ± 0.09	0.67 ± 0.16
Insoluble dietary fibre (%)	32.22 ± 1.67	21.77 ± 1.05
Neutral sugars (%)	19.06 ± 1.60	10.49 ± 0.96
Uronic acid (%)	1.26 ± 0.07	1.47 ± 0.09
Klason Lignin (%)	11.90 ± 0.28	9.81 ± 0.21
Total methylxanthines (mg/g dry matter)	5.62 ± 0.19	7.32 ± 0.93

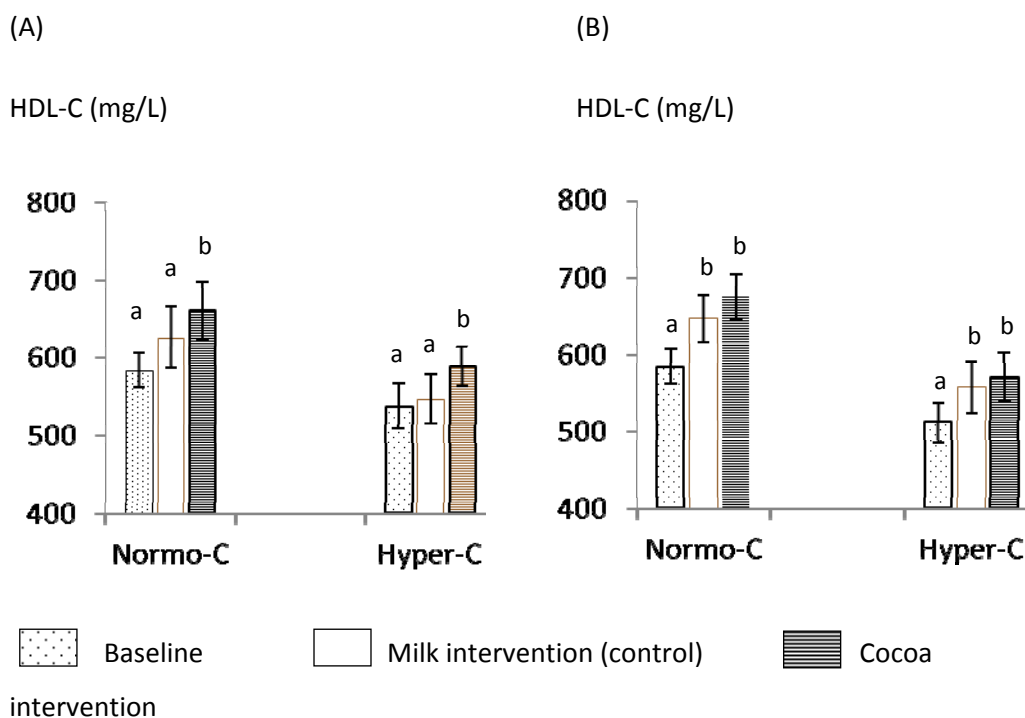
Theobromine (mg/g dry matter)	5.11 ± 0.14	6.43 ± 0.84
Theophylline (mg/g dry matter)	n.d.	0.01 ± 0.01
Caffeine (mg/g dry matter)	0.51 ± 0.05	0.88 ± 0.08

Values represent mean ±SD, n=6; n.d.: not detected.

Table 2. Daily intake of the cocoa product rich in dietary fibre (DFCP) and the product rich in polyphenols (PPCP) and the corresponding daily intake of bioactive compounds

	DFCP	PPCP
Cocoa dose (g)	30	15
Total flavanols (mg)	43.80	45.30
Epicatechin (mg)	9.30	18.90
Catechin (mg)	18.00	7.05
Procyanidin B1 (mg)	0.00	3.00
Procyanidin B2 (mg)	16.50	16.35
Total dietary fibre (g)	10.17	3.74
Soluble dietary fibre (g)	0.50	0.47
Insoluble dietary fibre (g)	9.67	3.27
Total methylxanthines (mg)	168.60	109.80
Theobromine (mg)	153.30	96.45
Theophylline (mg)	0.00	0.15
Caffeine (mg)	15.30	13.20

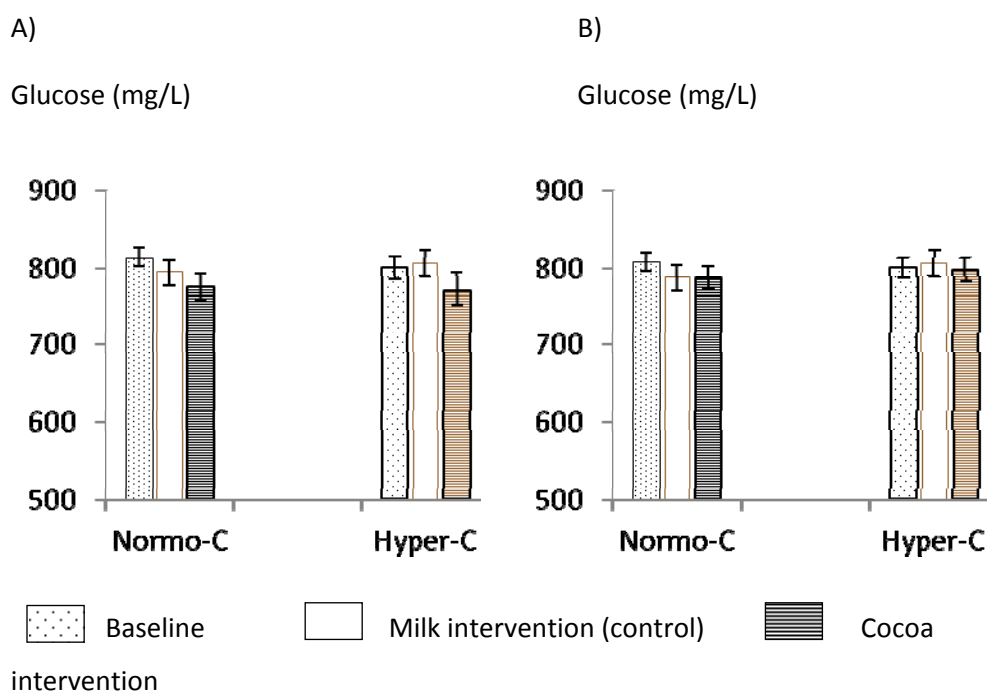
Figure 1. Effects of consuming (A) the cocoa product rich in fibre (DFCP) and (B) the cocoa product rich in polyphenols (PPCP) on HDL-cholesterol (HDL-C) levels in normocholesterolemic (Normo-C) and hypercholesterolemic (Hyper-C) subjects.



According to the general linear model of the variance for repeated measures analysis, the effect of consuming DFCP ($p < 0.001$) and PPCP ($p < 0.001$) on HDL-C was statistically significant, not showing differences between the groups.

Different letters (a, b) denote significant differences according to the Bonferroni test within the normocholesterolemic or hypercholesterolemic group.

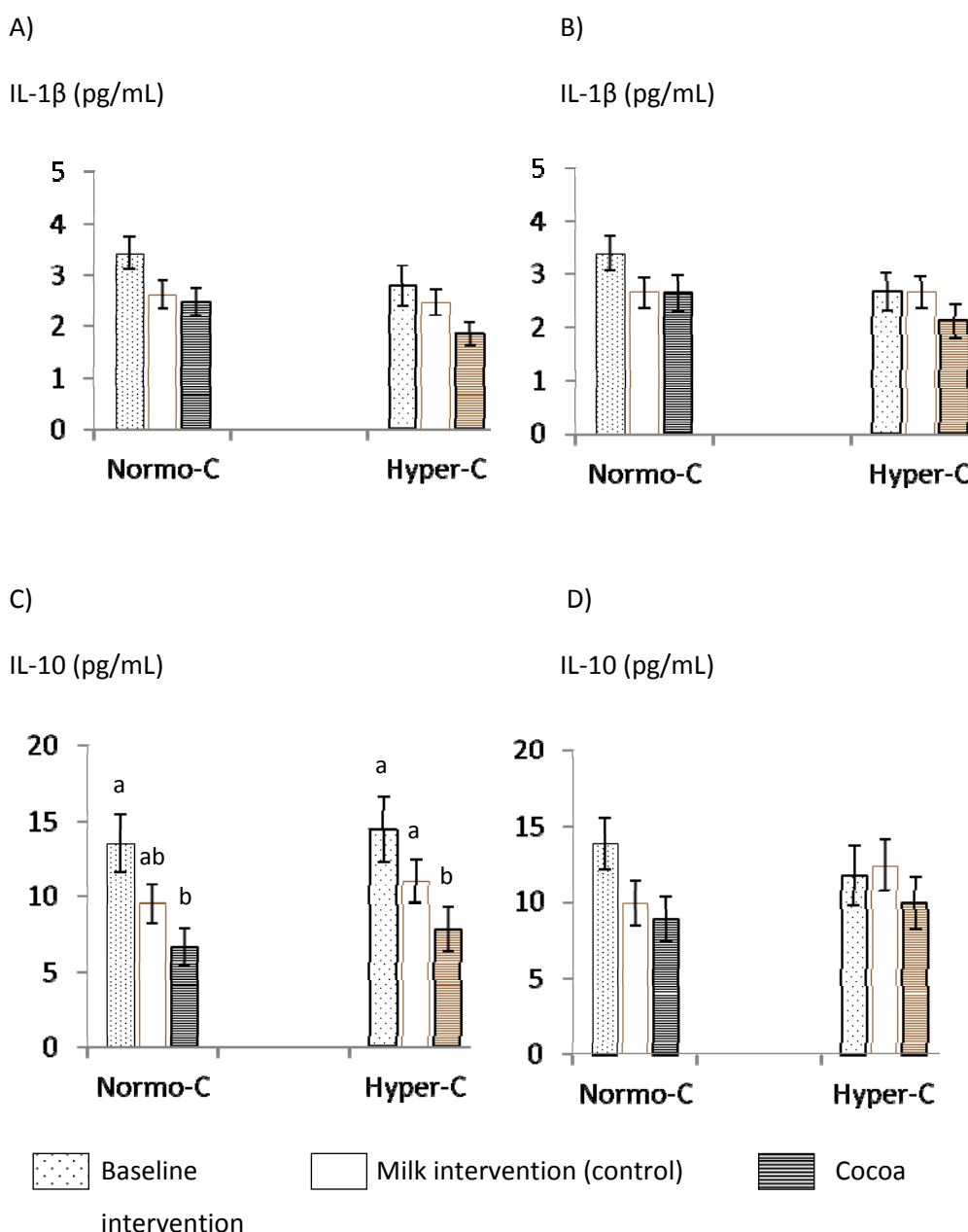
Figure 2. Effects of consuming (A) the cocoa product rich in fibre (DFCP) and (B) the cocoa product rich in polyphenols (PPCP) on glucose levels in normocholesterolemic (Normo-C) and hypercholesterolemic (Hyper-C) subjects.



According to the general linear model of the variance for repeated measures analysis, the effect of consuming DFCP ($p=0.029$) on glucose levels was statistically significant, in contrast to PPCP, not showing differences between the groups.

According to the Bonferroni test, there were no differences within the normocholesterolemic or hypercholesterolemic group.

Figure 3. Effects of consuming (A) the cocoa product rich in fibre (DFCP) and (B) the cocoa product rich in polyphenols (PPCP) on IL-1 β and effects of consuming DFCP (C) and PPCP (D) on IL-10 levels in normocholesterolemic (Normo-C) and hypercholesterolemic (Hyper-C) subjects.



According to the general linear model of the variance for repeated measures analysis, the effects of consuming DFCP on IL-1 β was statistically significant ($p=0.001$), in contrast

to PPCP, not showing differences between the groups; whereas the effect of both DFCP and PPCP on IL-10 ($p=0.001$ and $p=0.022$, respectively) were significant.

Different letters (a, b) denote significant differences according to the Bonferroni test within the normocholesterolemic or hypercholesterolemic group. The absence of letters indicates that there were no differences according to the paired test.

**EFFECTOS EN SALUD DE UN PRODUCTO
SOLUBLE DE CAFÉ MEZCLA
TOSTADO/VERDE**

Resumen

Dado que el café verde no ha experimentado las importantes pérdidas de compuestos bioactivos, fundamentalmente compuestos polifenólicos, que se producen durante el tostado, es cada vez mayor el interés en el estudio de los efectos en salud derivados del consumo de café verde. Sin embargo, precisamente por su elevado contenido en polifenoles, el café verde es muy astringente y no goza de buena aceptación por los consumidores. Existen suplementos dietéticos preparados a partir de extractos de semilla de café verde. No obstante, el objetivo general de esta Tesis Doctoral planteaba el estudio de los efectos en salud cardiovascular derivados del consumo de alimentos ricos en fitoquímicos (cacao y café verde) consumidos en dosis realistas en el marco de una dieta habitual, por lo que se descartó el empleo de suplementos dietéticos. Se optó por el empleo de un producto soluble de café mezcla de café verde y tostado, conteniendo un 35% de semillas sin tostar.

El objetivo específico abordado en este capítulo fue el siguiente:

Objetivo 3. Establecer el efecto del consumo de una bebida soluble de café conteniendo café verde en parámetros cardiometabólicos en voluntarios sanos y en población de riesgo.

Metodología

Se llevó a cabo un estudio crónico cruzado, aleatorizado, controlado, en 52 voluntarios sanos y sujetos en riesgo cardiovascular (hipercolesterolémicos). Tras una etapa basal de 2 semanas, con restricción de alimentos ricos en polifenoles y metilxantinas, los voluntarios fueron aleatoriamente asignados a 2 grupos, consumiendo diariamente tres tazas de café soluble mezcla tostado/verde (10,5 g/día) o una bebida control (agua o bebida isotónica sin polifenoles ni metilxantinas) durante 8 semanas. Tras esta primera etapa siguió un lavado de 2 semanas y posteriormente los voluntarios tomaron la otra bebida (control o café) durante 8 semanas.

Al final de cada etapa se tomaron muestras de sangre en ayunas y orina, se monitorizó presión arterial y frecuencia cardíaca, y se realizó un estudio antropométrico. Se controló la ingesta dietética y la actividad física mediante registros dietéticos y cuestionarios en distintos momentos a lo largo del estudio.

En las muestras sanguíneas se determinaron parámetros bioquímicos y hematológicos básicos, perfil lipídico, glucosa, capacidad antioxidante (FRAP, ABTS, ORAC), marcadores de oxidación a proteínas (grupos carbonilo) y lípidos (MDA) y diferentes marcadores de inflamación y función vascular: citoquinas pro- y anti-inflamatorias IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF- α , INF- γ , PCR, quimioquinas (MCP-1, MIP-1 β), moléculas de adhesión sVCAM-1 e sICAM-1, insulina, así como la hormona grelina y diversas adipoquinas (leptina, resistina, visfatina, inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1)). A partir de los valores de glucosa e insulina en ayunas se calcularon los índices HOMA de resistencia a la insulina (HOMA-IR) y función de células β pancreáticas (HOMA- β).

Resultados

El consumo regular y moderado del producto de café rico en ácidos hidroxycinámicos aportados por semillas de café verde, principalmente, mostró una mejora en el perfil lipídico de los voluntarios, con descensos significativos en los niveles séricos de CT, LDL-C, VLDL-C y de TG con respecto a la situación basal, en el grupo de voluntarios hipercolesterolémicos. A estos resultados se suma un efecto hipotensivo observado en ambos grupos, con valores significativamente menores de presión arterial sistólica y diastólica, así como de frecuencia cardíaca. Así mismo, el consumo del producto de café aumentó significativamente la capacidad antioxidante en suero de los voluntarios, disminuyó el daño oxidativo a lípidos y proteínas, y produjo un efecto hipoglucémico disminuyendo también el índice HOMA-IR.

Sin embargo, apenas se notaron efectos a nivel de la respuesta inflamatoria, ligeramente descendieron algunos marcadores inflamatorios o moléculas de adhesión como IL-1 β , IL-6, IL-7, TNF- α , IL-4, IL-10, MCP-1 o sVCAM-1 fundamentalmente en los voluntarios normocolesterolémicos, con tendencia contraria en el grupo de riesgo, aunque no alcanzando significación estadística en ninguno de los casos. Sí fue significativo el descenso en los niveles de PCR en ambos grupos, o de IL-2 y G-CSF en los sujetos sanos.

Cabe destacar que, sin modificar la ingesta y el gasto energético, se produjo un descenso significativo en el peso y el porcentaje de grasa corporal tras el consumo regular de café en ambos grupos de población. Estos resultados se explican en parte por el descenso significativo de los niveles de grelina, leptina, resistina y PAI-1 en ambos grupos de población, así como de visfatina en los sujetos normocolesterolémicos.

Conclusiones

El consumo regular de una dosis realista de café rico en polifenoles (mezcla tostado/verde) ejerce una importante acción hipotensiva, hipolipidémica, antioxidante y anti-inflamatoria que podría contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Además, los positivos efectos observados en la composición corporal unidos a la menor secreción de hormonas gástricas y adipoquinas confieren al café un importante papel en el control del peso. A esto se une el marcado efecto hipoglucémico y la mejora de índices relacionados con la función pancreática y la resistencia a la insulina, lo que sugiere que el café soluble conteniendo café verde podría afectar positivamente a otras patologías como obesidad o diabetes mellitus tipo 2.

Objetivo 3. Establecer el efecto del consumo de una bebida soluble de café conteniendo café verde en parámetros cardiometabólicos en voluntarios sanos y en población de riesgo.

5.3.2.1. Resultados

5.3.2.1.1. Ingestas dietéticas

En general, los voluntarios cumplieron las restricciones dietéticas propuestas al inicio del estudio (ver listado de alimentos no permitidos, restringidos y permitidos en Anexo 1) con la excepción de algún participante que anotó en la hoja de observaciones haber consumido algún alimento restringido puntualmente. A partir de los registros dietéticos de 72 h se estimaron la ingesta energética y de macronutrientes (Tabla 24) empleando el programa DIAL (Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM)). Los registros de 72 h que estimaron una ingesta energética diaria inferior al 70% de las ingestas recomendadas en casos de actividad ligera o superior al 130% a las recomendaciones en caso de actividad normal (Moreiras y cols., 2009), teniendo en cuenta la edad y el género de los sujetos, fueron descartados.

La ingesta de energía y de la mayoría de macronutrientes (Tabla 24) fue inferior a las recomendaciones dietéticas diarias según Moreiras y colaboradores (2009), con excepción de proteínas, lípidos y ácidos grasos saturados que fueron ligeramente superiores a las recomendadas (10-15%, 30-35% y <7% de la energía total suministrada por la dieta, respectivamente). La ingesta de colesterol de los voluntarios estaba por debajo del límite recomendado (<300 mg/día, Moreiras y cols., 2009). Como consecuencia del consumo de café no se observaron cambios en las ingestas estudiadas, con excepción del consumo de proteínas, que fue significativamente mayor ($p=0,025$) al inicio del estudio. Tampoco se observaron diferencias debidas al grupo en ninguna de las ingestas estudiadas.

Tabla 24. Ingesta de energía y macronutrientes durante el estudio con el producto de café mezcla tostado/verde.

	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
Etapa	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
Energía	1878±110	1854±79	1817±79	1860±83	1857±107	1779±95	N.S.	N.S.
FD	13,6±1,0	14,7±0,9	14,2±0,8	17,3±1,2	17,6±1,4	17,1±1,3	N.S.	N.S.
CH	180,0±12,3	180,6±7,9	177,0±10,2	184,2±8,1	167,8±11,8	169,9±11,1	N.S.	N.S.
Lípidos	77,9±5,1	76,0±3,4	74,7±4,5	78,0±3,2	71,9±3,5	69,0±5,4	N.S.	N.S.
Proteínas	87,2±4,8	79,3±4,3	78,9±4,2	79,7±4,4	75,9±3,9	73,5±3,6	0,025	N.S.
Colesterol	295,1±15,9	286,8±19,5	286,9±22,3	282,9±20,9	246,6±25,5	246,1±31,4	N.S.	N.S.
AGS	26,9±1,7	26,8±1,6	25,5±1,9	25,4±1,4	26,7±1,5	23,0±2,3	N.S.	N.S.
AGM	33,9±2,1	36,9±1,8	33,3±2,1	32,1±1,8	28,4±2,4	28,9±2,2	N.S.	N.S.
AGP	9,6±0,7	9,9±0,6	10,2±0,6	10,8±0,9	10,0±0,8	10,3±0,9	N.S.	N.S.

Los datos representan la media \pm error estándar en g/día, excepto para la energía y el colesterol que se expresan en kcal/día y mg/día, respectivamente. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados; FD: fibra dietética. N.S.: no significativo.

5.3.2.1.2. Antropometría

Tras el consumo regular del producto soluble de café mezcla tostado/verde, el peso corporal (Figura 18A), el IMC y el porcentaje de grasa corporal (Figura 18B) descendieron significativamente ($p=0,017$, $p=0,012$ y $p=0,001$, respectivamente) en ambos grupos de voluntarios (Tabla 25). De acuerdo con el test de pares de Bonferroni, el IMC de los voluntarios sanos tras la intervención con café era estadísticamente menor comparado con los valores basales y control, mientras que en el grupo hipercolesterolémico sólo era significativamente menor con respecto a la situación basal. En general, las medidas de las circunferencias y pliegues estudiadas apenas variaron a lo largo del estudio en ninguno de los grupos de voluntarios (Tabla 25), excepto la circunferencia del brazo, que aumentó ligeramente en el grupo de voluntarios sanos, y la circunferencia de la cintura, que no mostró cambios a lo largo

del estudio en este grupo mientras que tendió a disminuir en el grupo hipercolesterolémico, aunque no significativamente, por efecto del consumo de café, siendo por tanto las diferencias debidas al grupo significativas ($p=0,007$). Además, en el grupo de voluntarios sanos, se observa una disminución en el espesor del pliegue tricipital tras el consumo de café.

Tabla 25. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en los parámetros antropométricos.

	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
Etapas	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
Peso corporal	63,0±2,2	62,8±2,8	62,5±2,3	63,0±2,8	62,9±2,8	62,0±2,8	0,017	N.S.
Grasa corporal	22,8±1,4	23,7±1,4	21,5±1,2	25,4±1,3	24,4±1,2	23,6±1,3	0,001	N.S.
IMC	21,5±0,5 ^a	21,5±0,5 ^a	21,3±0,5 ^b	23,8±0,5 ^a	23,6±0,6 ^{ab}	23,4±0,6 ^b	0,012	N.S.
C. Cintura	70,4±1,3	70,6±1,4	70,9±1,4	76,8±2,5	76,6±2,5	75,6 ±2,5	N.S.	0,007
C. Cadera	97,2±1,1	96,7±1,2	96,4±1,3	96,4±1,3	96,6±1,4	96,3±1,2	N.S.	N.S.
C. Muslo	52,0±0,6	52,3±0,6	51,8±0,7	51,3±1,0	50,9±0,8	50,5±0,9	N.S.	N.S.
C. Brazo	27,2±0,5 ^a	27,4±0,5 ^{ab}	27,7±0,5 ^b	27,2±0,8	27,3±0,8	27,2±0,8	N.S.	N.S.
P. Tricipital	17,1±1,2	16,7±1,2	15,9±1,2	16,1±1,1	16,3±1,2	15,9±1,3	N.S.	N.S.
P. Subescapular	10,8±0,7	10,5±0,6	10,2±0,6	13,6±1,3	13,1±1,2	12,9±1,2	N.S.	N.S.

Los datos representan la media ± error estándar en kg para el peso corporal, en % para la grasa corporal, en kg/m² para el índice de masa corporal (IMC), en cm para las circunferencias (C) y en mm para los pliegues (P). Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última columna al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo según el test de pares Bonferroni. N.S.: no significativo.

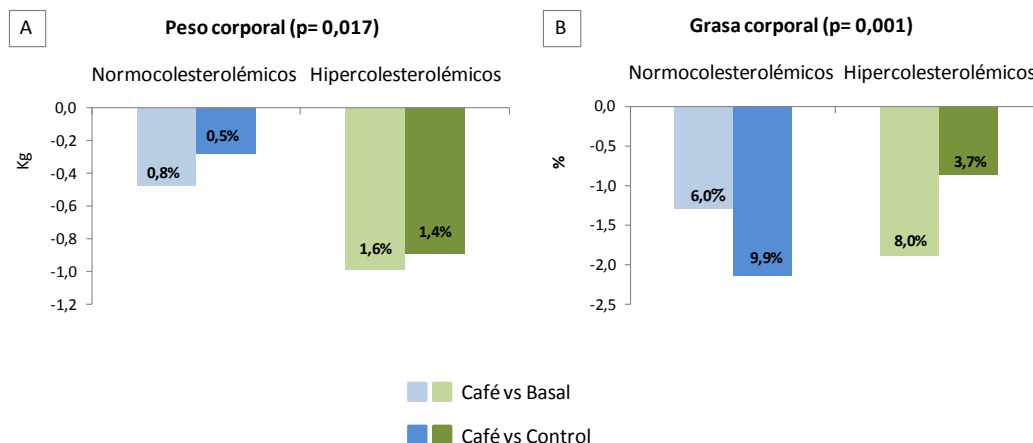


Figura 18. Efecto del consumo regular de café en el peso (A) y el porcentaje de grasa corporal (B) de los voluntarios. Las barras más claras representan la variación de los resultados obtenidos durante la etapa de café con respecto a la situación basal y las más oscuras con respecto a la bebida control para los dos grupos de voluntarios. Los números en cada barra representan el porcentaje de variación respecto al valor de referencia (Basal o Control).

5.3.2.1.3. Actividad Física

La actividad física desarrollada por los voluntarios puede clasificarse como ligera, lo que provocó que el gasto energético fuera moderado. Siguiendo las instrucciones dadas al inicio del estudio, los voluntarios no modificaron su actividad física a lo largo del estudio y por lo tanto el gasto energético total calculado no mostró cambios significativos en ninguno de los dos grupos de voluntarios (Tabla 26).

Tabla 26. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en el gasto energético total (GET).

Etapa	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
GET	2508±123	2558±141	2560±136	2526±140	2639±174	2516±130	N.S.	N.S.

Los datos representan la media \pm error estándar en kcal/día. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última columna al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. N.S.: no significativo.

5.3.2.1.4. Presión arterial y frecuencia cardiaca

En todos los voluntarios, tanto la PA sistólica como la diastólica y la FC disminuyeron, siendo los efectos hipotensivos del café mayores en el grupo hipercolesterolémico (Tabla 27).

La PA sistólica y diastólica de todos los voluntarios en la etapa basal del estudio estaba por debajo de 120 y 80 mm Hg, respectivamente (Tabla 27), por lo que pueden clasificarse como normotensos, aunque el grupo hipercolesterolémico presentó una mayor PA que el normocolesterolémico en todas las etapas de intervención. En concordancia con la PA, la FC de los participantes en el estudio estaba dentro del rango de normalidad (60-100 pulsaciones por minuto) (Tabla 27). El consumo de café mezcla tostado/verde mostró un claro efecto hipotensivo, ya que tanto la PA sistólica (Figura 19A) como la diastólica (Figura 19B), junto a la FC (Figura 19C), disminuyeron significativamente ($p=0,001$, $p<0,001$ y $p=0,035$, respectivamente) a lo largo del estudio según el test de medidas repetidas en los dos grupos de voluntarios. De acuerdo con el test de pares de Bonferroni, la PA sistólica y diastólica de los voluntarios hipercolesterolémicos fueron estadísticamente menores tras el consumo de café con respecto a la situación basal, sin mostrar diferencias con respecto al control.

Tabla 27. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en la presión arterial sistólica y diastólica y la frecuencia cardiaca.

Etapa	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
PAS	113,3±2,1	112,6±2,0	109,9±2,1	119,4±2,9 ^a	115,8±2,5 ^{ab}	114,2±3,1 ^b	0,001	N.S.
PAD	69,5±1,2	69,2±1,0	67,2±1,2	76,8±2,2 ^a	73,3±1,9 ^b	71,2±2,2 ^b	<0,001	N.S.
FC	67,9±1,7	66,7±1,8	65,5±2,1	70,1±1,6	69,9±1,7	67,5±1,8	0,035	N.S.

Los datos representan la media ± error estándar en mm Hg para la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) y en pulsaciones/minuto para la frecuencia cardiaca (FC). Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. N.S.: no significativo.

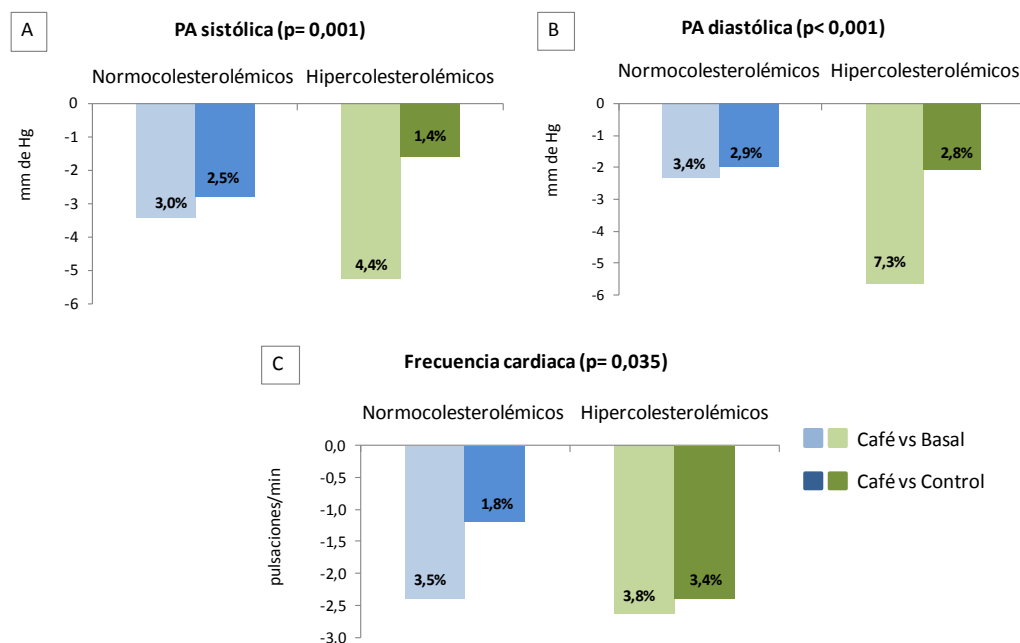


Figura 19. Efecto del consumo regular de café en los niveles de presión arterial (PA) sistólica (A), PA diastólica (B), y frecuencia cardiaca (C). Las barras más claras representan la variación de los resultados obtenidos durante la etapa de café con respecto a la situación basal y las más oscuras con respecto al control para los dos grupos de voluntarios en mm Hg para la PA y en pulsaciones/min para la frecuencia cardiaca. Los números en cada barra representan el porcentaje de variación respecto al valor de referencia (Basal o Control).

5.3.2.1.5. Bioquímica

Todos los parámetros bioquímicos determinados en este estudio se mantuvieron dentro de los rangos de referencia establecidos por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC), salvo en el grupo hipercolesterolémico, donde lógicamente los niveles de los biomarcadores lipídicos fueron más altos (Tabla 28).

El consumo de café mostró un claro efecto hipolipemiante en el grupo hipercolesterolémico, si bien no en el grupo sano, observándose por tanto un efecto significativo debido al grupo en los distintos parámetros valorados. El CT en sangre varió significativamente como consecuencia del consumo sostenido de café ($p=0,006$) (Tabla 28, Figura 20A). Los niveles de CT disminuyeron en el grupo de voluntarios hipercolesterolémicos en 21 mg/dL tras la intervención con café, lo que supone un 9,1% respecto a los valores de referencia en la etapa basal (Figura 20A), siendo

estadísticamente menor que el colesterol basal según el test de pares (Tabla 28). Por el contrario, los voluntarios sanos apenas variaron sus niveles sanguíneos de CT, confirmando las diferencias entre grupos ($p=0,001$).

Tabla 28. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en parámetros bioquímicos del perfil lipídico y función hepática.

	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
Etapas	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
CT	160,7±4,5	161,9±4,7	162,9±4,4	231,4±4,9 ^a	217,1±3,4 ^b	210,4±4,8 ^b	0,006	0,001
HDL-C	55,9±2,9	56,7±2,4	58,2±2,7	63,1±3,1	59,4±2,5	62,7±2,9	N.S.	N.S.
LDL-C	88,9±3,8	88,7±3,9	89,4±4,7	154,7±4,1 ^a	139,4±4,3 ^b	135,9±5,1 ^b	0,001	<0,001
VLDL-C	14,2±1,5	13,9±1,1	13,7±1,1	21,3±1,6 ^a	17,4±1,2 ^b	16,5±1,2 ^b	0,003	0,019
TG	71,3±7,1	70,0±5,2	71,0±5,7	103,3±7,5 ^a	86,6±5,5 ^{ab}	82,9±6,1 ^b	0,017	0,027
FL	177,8±6,1	180,6±3,8	179,1±5,6	226,6±5,8 ^a	214,1±3,6 ^b	218,9±5,3 ^{ab}	N.S.	N.S.
ALT	19,0±0,8	17,2±0,8	18,8±0,7	21,3±1,2	20,5±0,7	21,5±1,5	N.S.	N.S.
AST	16,8±1,3	14,3±1,1	15,1±1,4	21,4±2,1	18,6±1,3	19,4±2,0	N.S.	N.S.

Los datos representan la media ± error estándar en mg/dL, excepto para las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) que se expresan en UI/L. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. CT: colesterol total; FL: fosfolípidos; HDL-C: lipoproteínas de alta densidad; LDL-C: lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos; VLDL-C: lipoproteínas de muy baja densidad. N.S.: no significativo.

En lo que respecta a las lipoproteínas, los valores de HDL-C no mostraron diferencias significativas entre las distintas etapas del estudio, ni diferencias debidas al grupo. Por el contrario, los niveles de LDL-C disminuyeron significativamente ($p=0,001$) en el grupo de voluntarios hipercolesterolémicos tras la etapa control y todavía más como consecuencia del consumo de café; sin embargo, este parámetro no varió en el otro grupo de estudio, mostrando por tanto un efecto significativo debido al grupo

($p < 0,001$) (Tabla 28, Figura 20B). De forma similar, los niveles de VLDL-C también disminuyeron estadísticamente ($p = 0,003$), especialmente en el grupo de voluntarios hipercolesterolémicos donde la reducción fue de un 22,5% respecto a los valores basales, mostrando también diferencias significativas debidas al grupo ($p = 0,019$) (Tabla 28, Figura 20C). De acuerdo con el test de Bonferroni, los niveles de LDL-C y VLDL-C tras el consumo de café fueron estadísticamente menores que los de la situación basal en el grupo hipercolesterolémico, pero no con respecto al control.

Los niveles de TG en sangre también disminuyeron significativamente en el grupo de voluntarios hipercolesterolémicos ($p = 0,017$), con un descenso de más de 20 mg/dL (19,7% respecto a la situación basal), por lo que nuevamente el efecto del grupo fue significativo ($p = 0,027$) (Tabla 28, Figura 20D). Sin embargo, los fosfolípidos no variaron significativamente a lo largo del estudio según el análisis de medidas repetidas, aunque en el grupo de voluntarios hipercolesterolémicos disminuyeron significativamente en la etapa control con respecto a la situación basal, mientras que el descenso en la etapa café no fue significativo con respecto a las otras etapas (Tabla 28).

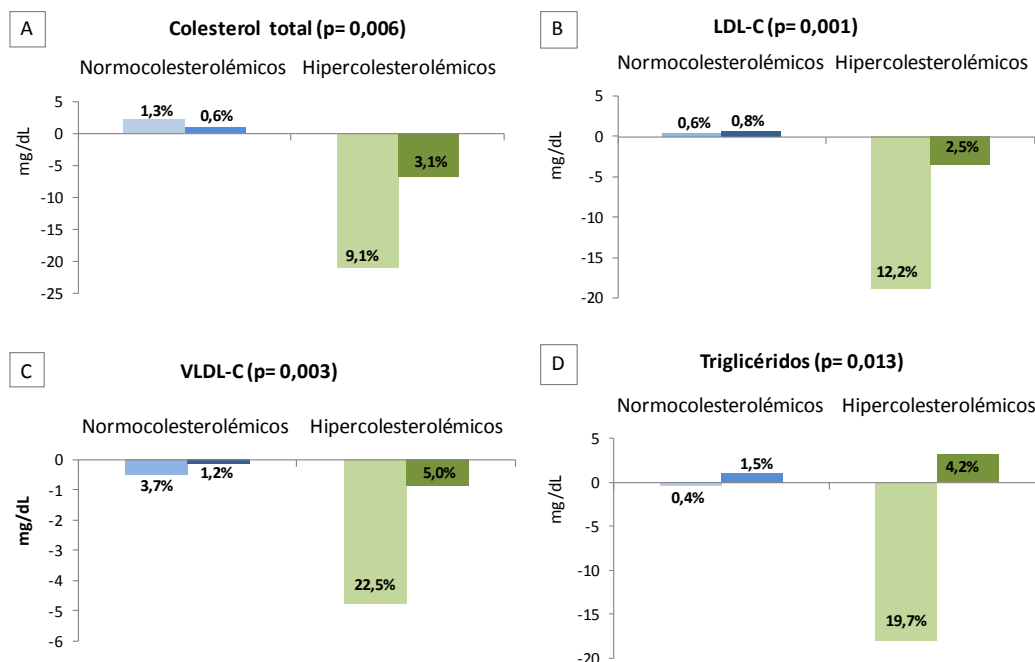


Figura 20. Efecto del consumo regular de café en los niveles de colesterol total (A), lipoproteínas de baja densidad (B), lipoproteínas de muy baja densidad (C) y triglicéridos (D). Las barras más claras representan la variación de los resultados obtenidos durante la etapa de café con respecto a la situación basal y las más oscuras con respecto a la bebida control para los dos grupos de voluntarios en mg/dL. Los números en cada barra representan el porcentaje de variación respecto al valor de referencia (Basal o Control).

Tras el consumo de café, los niveles de las enzimas ALT y AST no mostraron variaciones estadísticamente significativas (Tabla 28).

5.3.2.1.6. Inflamación

En general, el consumo de café no mostró una influencia sustancial a nivel del estado de inflamación de los participantes en el estudio, aunque es de señalar que se observaron distintas tendencias en los dos grupos de estudio. Así, mientras en los voluntarios sanos se observaban menores niveles de citoquinas pro-inflamatorias, en el grupo con riesgo cardiovascular la tendencia fue a incrementar los niveles de interleuquinas anti-inflamatorias, mientras que la proteína C reactiva mejoró en los dos grupos.

➤ Proteína C reactiva

El consumo regular de café durante 8 semanas hizo disminuir, aunque no significativamente según el análisis de medidas repetidas, los niveles de PCR (Tabla 29); sin embargo, sí se observa un efecto significativo debido al grupo ($p=0,003$), ya que los niveles de PCR en el grupo normocolesterolémico en todas las etapas fueron más bajos que en el hipercolesterolémico y el descenso producido por la ingesta de café fue mayor en el grupo hipercolesterolémico. En ambos grupos de voluntarios las concentraciones de PCR se mantuvieron dentro de los valores de referencia normales ($< 0,1$ mg/dL). Según el test de pares, en los individuos sanos esta proteína de fase aguda fue significativamente más baja tras el consumo de café con respecto a las etapas basal y control, y en el grupo hipercolesterolémico se observaron diferencias significativas entre las tres intervenciones en el siguiente sentido basal>control>café.

Tabla 29. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en los niveles de proteína C reactiva.

Etapa	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
PCR	0,041±0,01 ^a	0,041±0,01 ^a	0,028±0,01 ^b	0,078±0,02 ^a	0,072±0,02 ^b	0,052±0,02 ^c	N.S.	0,003

Los datos representan la media \pm error estándar de la proteína C reactiva (PCR) en mg/dL. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. N.S.: no significativo.

➤ Citoquinas y quimioquinas

Atendiendo a la clasificación de Kokkonen y colaboradores (2010) se expresan en tablas separadas los resultados de las citoquinas de activación general IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α (Tabla 30), las relacionadas con las células del sistema inmune IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ (Tabla 31), las relacionadas con la médula ósea IL-7, G-CSF y GM-CSF (Tabla 32) y las quimioquinas MCP-1 y MIP-1 β (Tabla 33). En general, los valores observados para estos parámetros fueron mayores a los obtenidos por otros autores mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; Cesari y cols., 2003; Sacanella y cols., 2007; Kokkonen y cols., 2010), a excepción de IL-4, IL-7, G-CSF, MCP-1 y TNF- α .

Como se ha indicado anteriormente, desde el punto de vista de la inflamación los voluntarios normocolesterolémicos mostraron una tendencia a la mejora, aunque las citoquinas pro-inflamatorias de activación general estudiadas no mostraron modificaciones estadísticamente relevantes a lo largo del estudio (Tabla 30). No obstante, cabe mencionar una tendencia en este grupo a reducir los niveles de los cuatro biomarcadores estudiados tras la intervención con café, con disminuciones comprendidas entre el 16 y el 50% de los valores observados en la etapa basal, aunque sólo fue significativa esta bajada en el caso de la IL-2 de acuerdo con el test de pares de Bonferroni. Por el contrario, en los voluntarios hipercolesterolémicos prácticamente no se modificaron los niveles de estos parámetros.

Tabla 30. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en interleuquinas de activación general.

Etapa	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
IL-1β	5,0 \pm 0,6	4,4 \pm 0,4	3,7 \pm 0,5	5,1 \pm 0,6	5,1 \pm 0,5	5,0 \pm 0,6	N.S.	N.S.
IL-2	14,7 \pm 2,1 ^a	10,0 \pm 1,1 ^{ab}	7,3 \pm 1,5 ^b	14,1 \pm 2,5	12,6 \pm 1,2	15,1 \pm 1,7	N.S.	0,029
IL-6	17,8 \pm 2,0	16,8 \pm 1,8	14,9 \pm 2,1	17,5 \pm 1,9	18,2 \pm 1,7	18,7 \pm 1,9	N.S.	N.S.
TNF-α	23,17 \pm 1,9	19,9 \pm 2,3	16,8 \pm 2,7	21,2 \pm 2,1	22,9 \pm 2,4	21,6 \pm 2,9	N.S.	N.S.

Los datos representan la media \pm error estándar en pg/mL. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. IL: interleuquina; IL-1 β : interleuquina 1 β ; IL-2: interleuquina 2; IL-6: interleuquina 6; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa. N.S: no significativo.

De forma similar, con respecto a las citoquinas pro-inflamatorias IL-12, IFN- γ , IL-5 e IL-17 (Tabla 31), se observa una tendencia a reducir los niveles de IFN- γ , IL-5 e IL-17 tras la intervención con café en el grupo de voluntarios sanos, con descensos entre el 19 y el 25% respecto a los valores de la etapa basal, mientras que los hipercolesterolémicos prácticamente no modificaron los niveles de estos parámetros. Por el contrario, los niveles de IL-12 fueron estadísticamente mayores que los de la etapa control en el grupo de voluntarios sanos, pero no respecto a la situación basal según el test de pares.

Las citoquinas anti-inflamatorias IL-4, IL-13 e IL-10 no mostraron cambios significativos a lo largo del estudio (Tabla 31), aunque se observa una tendencia en el grupo de voluntarios normocolesterolémicos al descenso de estos tres parámetros frente a un incremento en el grupo hipercolesterolémico. En el caso de la IL-10, los niveles se redujeron un 17% en el grupo normocolesterolémico y aumentaron un 40% en el hipercolesterolémico, llegando a ser estadísticamente significativo el efecto del grupo para esta citoquina ($p=0,046$).

Tabla 31. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en citoquinas relacionadas con células Th1 (IL-12 e IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), Th17 (IL-17) y células reguladoras T (IL-10) del sistema inmune.

Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
Etapas	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café Grupo
Citoquinas relacionadas con células Th1							
IL-12	53,54 \pm 6,8 ^a	39,32 \pm 5,5 ^b	65,40 \pm 5,1 ^a	56,22 \pm 6,3	54,95 \pm 5,1	53,84 \pm 4,7	N.S. N.S.
IFN-γ	297,01 \pm 33,7	293,80 \pm 29,5	233,53 \pm 41,0	312,13 \pm 30,7	342,17 \pm 26,9	336,11 \pm 37,5	N.S. N.S.
Citoquinas relacionadas con células Th2							
IL-4	3,13 \pm 0,3	2,70 \pm 0,3	2,56 \pm 0,3	3,09 \pm 0,3	3,40 \pm 0,3	3,59 \pm 0,3	N.S. N.S.
IL-5	8,45 \pm 0,8	7,54 \pm 0,8	6,30 \pm 1,4	9,55 \pm 0,7	8,74 \pm 0,7	9,12 \pm 1,2	N.S. N.S.
IL-13	12,83 \pm 1,0	11,35 \pm 0,9	11,87 \pm 1,2	11,36 \pm 1,1	12,73 \pm 1,0	14,17 \pm 1,3	N.S. N.S.
Citoquinas relacionadas con células Th17							
IL-17	31,25 \pm 5,7	26,21 \pm 3,7	25,30 \pm 5,9	35,27 \pm 4,9	36,57 \pm 3,1	36,57 \pm 5,0	N.S. N.S.
Citoquinas relacionadas con células reguladoras T							
IL-10	19,44 \pm 2,6	15,45 \pm 2,2	16,17 \pm 2,2	16,19 \pm 2,7	17,52 \pm 2,4	22,72 \pm 2,3	N.S. 0,046

Los datos representan la media \pm error estándar en pg/mL. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. IFN- γ : interferón gamma; IL-4: interleuquina 4; IL-5: interleuquina 5; IL-10: interleuquina 10; IL-12: interleuquina 12; IL-13: interleuquina 13; IL-17: interleuquina 17. N.S.: no significativo.

En consonancia con los resultados anteriores, la interleuquina IL-7 y G-CSF, citoquinas hematopoyéticas relacionadas con la médula ósea, no se modificaron estadísticamente tras la ingesta regular de café en ninguno de los dos grupos de voluntarios (Tabla 32), aunque hubo una tendencia a reducir los niveles de ambas citoquinas (-18% en el caso de IL-7 y -27% para G-CSF con respecto a los valores de la etapa basal) en el grupo de voluntarios normocolesterolémicos. De acuerdo con el test de pares, este último parámetro fue significativamente menor tras la intervención con café con respecto a la situación basal. En el caso de GM-CSF, la reducción se dio en el grupo hipercolesterolémico (-15% respecto a la etapa basal).

Tabla 32. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en citoquinas y factores hematopoyéticos de la médula ósea.

Etapa	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
G-CSF	38,8±2,6 ^a	30,7±2,5 ^b	28,5±3,3 ^b	38,4±2,7	37,2±2,6	40,6±3,4	N.S.	N.S.
GM-CSF	221,9±28,7	202,1±17,9	220,8±14,3	222,0±26,7	201,9±16,7	189,4±13,3	N.S.	N.S.
IL-7	12,5±1,0	11,7±0,9	10,2±1,2	12,7±1,2	12,4±1,0	13,3±1,4	N.S.	N.S.

Los datos representan la media ± error estándar en pg/mL. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; IL-7: interleuquina 7. N.S.: no significativo.

En lo que se refiere a las quimioquinas estudiadas (Tabla 33), ni MIP-1 β ni MCP-1 mostraron cambios significativos como consecuencia del consumo del producto de café, ni debidos al grupo.

Tabla 33. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en quimioquinas.

Etapa	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
MCP-1	87,9±5,2	89,4±4,2	77,4±5,6	90,5±5,8	97,1±4,7	97,2±6,2	N.S.	N.S.
MIP-1β	102,9±6,9	110,7±5,8	107,8±5,8	111,9±7,1	120,7±4,5	108,4±4,6	N.S.	N.S.

Los datos representan la media ± error estándar en pg/mL. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; MIP-1β: proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta. N.S.: no significativo.

➤ Moléculas de adhesión

Tampoco los niveles de las moléculas de adhesión sICAM-1 y sVCAM-1 observados mostraron cambios significativos como consecuencia del consumo de café (Tabla 34), aunque cabe mencionar una ligera tendencia a disminuir en el grupo de voluntarios normocolesterolémicos. Los valores observados fueron inferiores a los reportados por Monagas y colaboradores (2009) en sujetos sanos y de riesgo cardiovascular (316-402 y 846-1138 ng/mL, respectivamente).

Tabla 34. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en las moléculas de adhesión.

Etapa	Normocolesterolémicos (n= 25)			Hipercolesterolémicos (n= 27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
sICAM-1	194,6±4,9	204,5±5,2	187,2±5,3	192,1±5,3	194,1±5,7	188,8±5,7	N.S.	N.S.
sVCAM-1	263,4±8,7	252,0±7,5	253,6±9,0	249,9±9,1	255,0±7,9	258,8±9,5	N.S.	N.S.

Los datos representan la media ± error estándar en pg/mL. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. sICAM-1: moléculas de adhesión intercelular tipo 1 solubles; sVCAM-1: moléculas de adhesión vascular tipo 1 solubles. N.S.: no significativo.

➤ Hormonas gastrointestinales y adipoquinas

Los niveles de la hormona gastrointestinal grelina disminuyeron significativamente ($p < 0,001$) en ambos grupos (Tabla 35), siendo este descenso más acusado en el grupo de voluntarios sanos. De acuerdo con el test de pares de Bonferroni, la grelina se redujo significativamente en el grupo normocolesterolémico tras el consumo regular de café con respecto a las otras dos etapas, mientras que en el grupo hipercolesterolémico sólo lo hizo con respecto a la situación basal.

Las adipoquinas leptina, PAI-1 y resistina disminuyeron significativamente ($p = 0,001$, $p < 0,001$ y $p = 0,034$, respectivamente) en los dos grupos de estudio (Tabla 35). De acuerdo con el test de pares de Bonferroni, tras el consumo de café los niveles de leptina y resistina eran estadísticamente menores con respecto a la situación basal en ambos grupos de voluntarios. De forma similar, los niveles de PAI-1 tras la intervención con café eran significativamente menores en ambos grupos de intervención con respecto a la situación basal y en el grupo de voluntarios sanos también con respecto a la bebida control.

Tabla 35. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en las adipoquinas y la grelina.

Etapas	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
Grelina	1110±62 ^a	896±51 ^b	715,4±50 ^c	1043±58 ^a	920±38 ^b	878±56 ^b	<0,001	N.S.
Leptina	3341±379 ^a	2854±367 ^b	2685±349 ^b	3393±381 ^a	2581±310 ^{ab}	2566±306 ^b	0,001	N.S.
PAI-1	3579±175 ^a	3397±207 ^a	2757±158 ^b	3980±260 ^a	3652±205 ^{ab}	3165±233 ^b	<0,001	N.S.
Resistina	3666±152 ^a	3455±201 ^{ab}	3159±163 ^b	3703±190 ^a	3495±261 ^{ab}	3297±130 ^b	0,034	N.S.
Visfatina	3302±322 ^a	2721±318 ^{ab}	2417±397 ^b	3480±240	3263±342	3185±395	N.S.	N.S.

Los datos representan la media ± error estándar en pg/mL. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b, c) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares de Bonferroni. PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno-1. N.S.: no significativo.

Los niveles de visfatina, que también se redujeron en ambos grupos de voluntarios, no alcanzaron el nivel de significación estadística; no obstante, de acuerdo con el test de pares, este parámetro disminuyó significativamente por efecto del café comparado con la situación basal en el grupo de voluntarios sanos.

5.3.2.1.7. Biomarcadores de estado oxidativo

➤ Capacidad antioxidante

Se valoró la capacidad antioxidante (CAO) en el suero de los voluntarios en ayunas aplicando los métodos ORAC, FRAP y ABTS (Tabla 36). Como consecuencia del consumo del producto soluble de café, la CAO medida en el suero de los voluntarios aumentó significativamente de acuerdo con los resultados de ORAC y FRAP ($p < 0,001$, en ambos casos) en ambos grupos de voluntarios (Figura 21A y 21B, respectivamente). De acuerdo con el test de pares, en los voluntarios sanos los valores de ORAC tras la ingesta de café eran estadísticamente mayores con respecto a los valores basales, mientras que en el grupo hipercolesterolémico eran mayores con respecto a la etapa control. Los valores de FRAP tras la etapa café fueron significativamente mayores que los del control en ambos grupos de estudio según el test de pares. Por el contrario, los valores de ABTS no mostraron diferencias que llegaran al nivel de significación estadística, aunque fueron ligeramente superiores como consecuencia del consumo de café en el grupo hipercolesterolémico (Tabla 36, Figura 21C).

Tabla 36. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en la capacidad antioxidante del suero.

Etapas	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
ORAC	15428±459 ^a	15543±416 ^{ab}	17136±552 ^b	16443±685 ^{ab}	15756±702 ^b	19007±1015 ^a	<0,001	N.S.
FRAP	581,4±17,3 ^a	530,6±16,38 ^b	612,8±23,17 ^a	534,2±26,0 ^{ab}	516,7±17,5 ^a	580,9±23,4 ^b	<0,001	N.S.
ABTS	3182,4±57,4	3144,0±48,9	3181,5±76,3	3195,4±42,7	3201,6±59,7	3397,1±75,6	N.S.	N.S.

Los datos representan la media ± error estándar en µM de equivalentes de Trolox (TE). Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última columna al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. N.S.: no significativo.

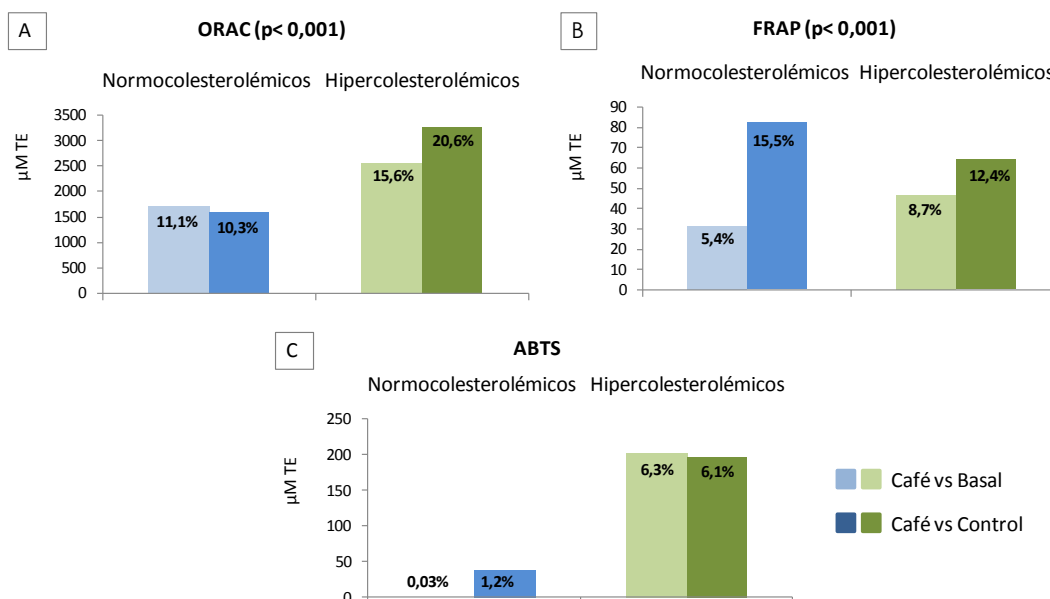


Figura 21. Efecto del consumo regular de café en la capacidad antioxidante del suero, medida por las técnicas ORAC (A), FRAP (B) y ABTS (C). Las barras más claras representan la variación de los resultados obtenidos durante la etapa de café con respecto a la situación basal y las más oscuras con respecto a la bebida control para los dos grupos de voluntarios en μM de equivalentes de Trolox (TE). Los números en cada barra representan el porcentaje de variación respecto al valor de referencia (Basal o Control).

➤ Daño oxidativo a lípidos y proteínas

El daño oxidativo a lípidos en suero, cuantificado como niveles de MDA, se redujo significativamente ($p=0,015$) por efecto del consumo del café mezcla tostado/verde tanto en los voluntarios sanos como hipercolesterolémicos (Tabla 37). Dentro del grupo normocolesterolémico, los valores de MDA fueron estadísticamente menores tras la ingesta de café con respecto a la etapa basal, mientras que en el grupo hipercolesterolémico las diferencias no llegaron al nivel de significación estadística a pesar de suponer una reducción del 10,3% respecto a la etapa basal y del 12,3% respecto a la etapa control (Figura 22A).

En concordancia, el daño oxidativo a proteínas séricas, cuantificado a través de la determinación de GC, también fue significativamente menor ($p < 0,001$) como consecuencia del consumo de café, siendo estadísticamente diferente el efecto del grupo ($p=0,011$) (Tabla 37). En el grupo normocolesterolémico, los niveles de GC se

redujeron un 33% tras la intervención con café con respecto a la situación basal y un 29% respecto a la etapa control, mientras que en el grupo hipercolesterolémico se redujeron un 35% únicamente respecto a la etapa basal (Figura 22B).

Tabla 37. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en el daño oxidativo a lípidos y proteínas.

Etapa	Normocolesterolémicos (n=25)			Hipercolesterolémicos (n=27)			p valor	
	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
MDA	2,18±0,13 ^a	2,02±0,09 ^{ab}	1,83±0,08 ^b	2,23±0,11	2,28±0,10	2,00±0,08	0,015	N.S.
GC	0,36±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,24±0,01 ^b	0,40±0,01 ^a	0,29±0,02 ^b	0,26±0,02 ^b	<0,001	0,011

Los datos representan la media ± error estándar en nmol/mL de suero para el malondialdehído (MDA) y en nmol/mg de proteína para los grupos carbonilos (GC). Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última columna al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. N.S.: no significativo.

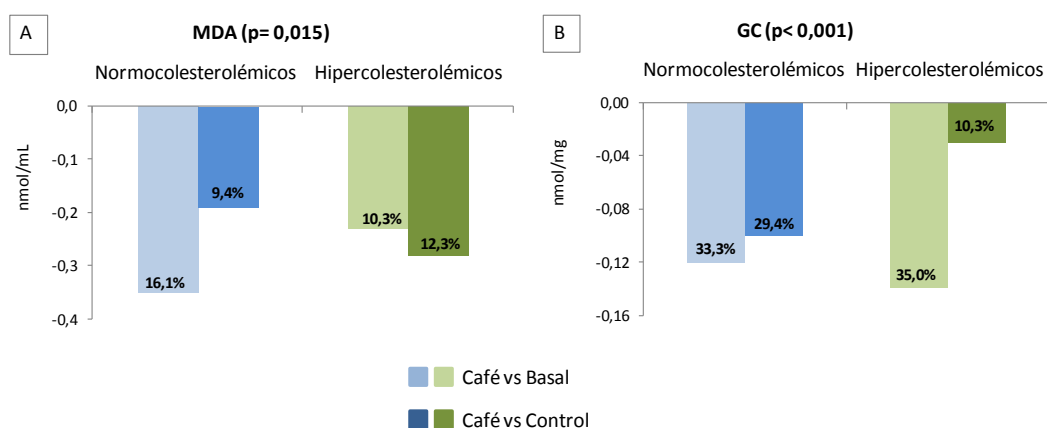


Figura 22. Efecto del consumo regular de café en la concentración de malondialdehído (MDA; A) y de grupos carbonilos (GC; B) en suero. Las barras más claras representan la variación de los resultados obtenidos durante la etapa de café con respecto a la situación basal y las más oscuras con respecto a la bebida control para los dos grupos de voluntarios en nmol de MDA/mL de suero y nmol de GC/mg de proteína. Los números en cada barra representan el porcentaje de variación respecto al valor de referencia (Basal o Control).

5.3.2.1.8. Glicemia y resistencia a la insulina

La concentración de glucosa en ayunas en los dos grupos de estudio presentó valores dentro del rango de la normalidad según la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) (Tabla 38). Igualmente, los resultados de insulina coinciden con los descritos por Lecoultre y colaboradores (2014) determinados mediante radioinmunoensayo ($10,7 \pm 0,9$ mU/L). Por su parte, los valores de HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance; Matthews y cols., 1985), uno de los índices más ampliamente utilizados como marcador de resistencia a la insulina (Trikudanathan y cols., 2013), fueron semejantes a los observados en adultos sanos según Lichnovska y colaboradores (2002) ($1,7 \pm 0,8$ en hombres y $1,7 \pm 0,9$ en mujeres), así como según los referidos por Acosta y colaboradores (2002) ($1,96 \pm 0,57$) o por Bonora y colaboradores (1989) ($2,06 \pm 0,14$); sin embargo, los valores obtenidos en el presente estudio son superiores a los del trabajo original de Matthews y colaboradores (1985) y en el más reciente de Pham y colaboradores (2014) en una población joven y sana, estando en ambos casos próximos a 1. Adicionalmente se estimó también la sensibilidad a la insulina a través del índice QUICKI, que guarda una buena correlación con el índice HOMA-IR dado que ambos parámetros se calculan a partir de los valores de glucosa e insulina en ayunas, observando en los voluntarios sanos e hipercolesterolémicos, valores semejantes a los descritos por Katz y colaboradores (2000) en voluntarios sanos ($0,382 \pm 0,007$). Finalmente, se calculó el parámetro HOMA- β (Homeostatic Model Assessment of β -cell Function; Matthews y cols., 1985) como marcador de secreción de insulina y, por tanto, de la función de la célula β pancreática (Agardh y cols., 2004), siendo los resultados obtenidos en el presente trabajo (Tabla 38) inferiores a los observados por Pham y colaboradores (2014) (56,1-63,6 %).

El consumo regular del café mezcla tostado/verde dio lugar a efectos positivos sobre el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina, ya que disminuyeron significativamente las concentraciones en sangre de glucosa en ayunas y de HOMA-IR ($p=0,004$ y $0,045$, respectivamente), tanto en los voluntarios sanos como en los que presentaban riesgo cardiovascular, y se elevaron significativamente los valores de sensibilidad a la insulina estimados por el índice QUIKI ($p=0,038$). Los niveles de glucosa en el grupo normocolesterolémico fueron mayores en la etapa control, mientras que en el grupo hipercolesterolémico decrecieron en el orden basal>control>café, lo que supuso un efecto debido al grupo ($p=0,036$). De acuerdo con el test de pares, los índices HOMA-IR y QUICKI disminuyeron estadísticamente tras la intervención con café con respecto a las etapas basal y control, mientras que los niveles de glucosa en ayunas lo hicieron sólo con respecto a la etapa basal. Dado que los niveles de glucosa y de HOMA-IR son los marcadores más relevantes de la diabetes mellitus tipo 2 y están asociados con un mayor riesgo cardiovascular (Bohn y cols., 2012), se puede decir que la ingesta moderada del producto de café estudiado presentó un efecto protector frente a la

diabetes tipo 2 y disminuyó el riesgo cardiovascular. Otros efectos beneficiosos del café que no llegaron a alcanzar el nivel de significación estadística fueron la disminución de los niveles de insulina en ayunas en el grupo normocolesterolémico y el incremento de la función de las células β pancreáticas (HOMA- β) con respecto a la etapa basal y control en ambos grupos de estudio.

Tabla 38. Efecto del consumo regular de café mezcla tostado/verde en la glicemia e insulinemia en ayunas y en índices de resistencia/sensibilidad a la insulina (HOMA-IR/QUICKI) y función pancreática (HOMA- β).

	Normocolesterolémicos (n= 25)			Hipercolesterolémicos (n= 27)			p valor	
Etapas	Basal	Control	Café	Basal	Control	Café	Café	Grupo
Glucosa	74,39 \pm 1,41 ^{ab}	78,68 \pm 1,68 ^a	71,74 \pm 1,44 ^b	76,95 \pm 1,66	74,57 \pm 1,97	72,88 \pm 1,69	0,004	0,036
Insulina	9,52 \pm 0,47	9,73 \pm 0,38	8,44 \pm 0,43	10,33 \pm 0,54	10,12 \pm 0,45	10,14 \pm 0,50	N.S.	N.S.
HOMA-IR	1,74 \pm 0,09 ^a	1,89 \pm 0,12 ^a	1,49 \pm 0,12 ^b	1,96 \pm 0,11	1,69 \pm 0,14	1,70 \pm 0,13	0,045	N.S.
HOMA- β	24,2 \pm 3,72	28,4 \pm 4,21	38,2 \pm 7,25	33,7 \pm 4,43	33,61 \pm 5,00	43,4 \pm 8,23	N.S.	N.S.
QUICKI	0,353 \pm 0,003 ^a	0,350 \pm 0,002 ^a	0,361 \pm 0,003 ^b	0,345 \pm 0,003	0,347 \pm 0,003	0,348 \pm 0,003	0,038	N.S.

Los datos representan la media \pm error estándar en mg/dL para la glucosa, mU/L para la insulina y en % para el HOMA- β ; HOMA-IR y QUICKI se dan en unidades arbitrarias. HOMA-IR: modelo homeostático de valoración de la resistencia a la insulina; HOMA- β : modelo homeostático de medida de la funcionalidad de las células β ; QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index. Los valores de la penúltima columna corresponden al efecto de tomar el producto de café y los de la última al efecto del grupo según el análisis general de medidas repetidas. Los superíndices (a, b) representan las diferencias observadas entre etapas dentro de un mismo grupo, según el test de pares Bonferroni. N.S.: no significativo.

5.3.2.2. Discusión

Nuestro estudio demuestra que el consumo regular y moderado de una mezcla de café tostado/verde presenta un claro efecto cardioprotector, principalmente en individuos hipercolesterolémicos, al reducir la presión arterial, los niveles de lípidos séricos elevados, el peso y porcentaje de grasa corporal y al aumentar la capacidad antioxidante en suero. Por lo tanto, estos resultados están en línea con diversos meta-análisis que concluyen que hay una asociación inversa entre el consumo habitual de café y el riesgo de insuficiencia (Mostofsky y cols., 2012) o enfermedad cardíaca (Sofi y cols., 2007). Otros autores también apoyan que el consumo de café no tiene efectos adversos sobre la calidad de vida desde el punto de vista de la salud (López-García y cols., 2014) y, por lo tanto, el café tomado regularmente puede formar parte de una dieta saludable de la población en general e incluso de la población con riesgo cardiovascular (O'Keefe y cols., 2013).

5.3.2.2.1. Parámetros antropométricos

La mayoría de los estudios que investigan el efecto del café o de la CF sobre el peso corporal han sido realizados en sujetos obesos o con sobrepeso, mostrando resultados contradictorios. Astrup y colaboradores (1992) no observaron ningún efecto en un estudio cruzado con placebo en individuos obesos que tomaron 200 mg de CF tres veces al día durante 8 semanas. Por el contrario, el consumo de 750 mL diarios de un producto de café de la variedad Arábica, mezcla de semillas verdes y tostadas, que aportaba 440 mg diarios de derivados hidroxicinámicos y 540 mg de CF, dio lugar a una reducción de 0,7 kg de peso y una pérdida de grasa corporal del 5% en sujetos con ligero sobrepeso (peso > 85 kg y un IMC de 25,6 kg/m²; Bakuradze y cols., 2011). Nuestros resultados están en consonancia con los de este último estudio, ya que aunque los participantes del presente estudio eran normopeso (el peso medio era menor de 63 kg y tenían un IMC < 25 kg/m²), los grupos nomocolesterolémico e hipercolesterolémico redujeron en 0,5 y 1 kg su peso tras la intervención con el producto de café con respecto al valor basal. Lo que es aún más interesante es que mostraron una disminución en el porcentaje de grasa corporal del 1,3 y 1,9%, respectivamente, con respecto a la situación basal (Figura 18). Nuestros resultados son del mismo orden que los observados tras la ingesta aguda de café (4 mg de CF/kg de peso), que incrementaba el gasto metabólico en sujetos normopeso y obesos, produciendo en los primeros una mayor oxidación de grasa (Acheson y cols., 1980).

Entre los componentes del café que producen estos efectos sobre el peso, la CF parece ser la principal responsable. Además del conocido efecto saciante de esta metilxantina, diversos trabajos muestran que puede incrementar la termogénesis o gasto energético, la lipólisis, la beta-oxidación de grasas y la secreción de insulina, favoreciendo así la pérdida de peso y la reducción de la grasa corporal (Shi y cols., 1991; Ranheim & Halvorsen, 2005). Otros componentes del café que contribuyen a su efecto adelgazante son los compuestos polifenólicos. Los mecanismos por los que los polifenoles del café pueden contribuir a la reducción del peso en humanos aún están siendo esclarecidos, pero se apunta a que los ácidos cafeico y clorogénico (5-CQA) inhiben la amilasa pancreática *in vitro* (Narita & Inouye, 2009), reduciendo así la absorción de glucosa, que también se ha asociado a una menor actividad de los transportadores de glucosa dependientes de sodio (SGLT) en el epitelio intestinal o una modulación de los niveles de hormonas intestinales como los péptidos GLP-1 (glucagon-like peptide-1 o péptido 1 similar a glucagón) o GIP (polipéptido insulínico dependiente de glucosa; revisado en Bravo y cols., 2010). Además, parece que los polifenoles del café reducen la actividad de las SREBPs, evitando así la lipogénesis y, por tanto, la acumulación de grasa, tal como se ha observado en ratones (Murase y cols., 2011).

Teniendo en cuenta que el café verde presenta una mayor concentración de polifenoles que el café tostado, los productos que contienen café verde tendrían un mayor potencial para producir cambios antropométricos positivos. En este sentido, se ha descrito una reducción del peso y grasa corporal de 5,4 kg y 3,6%, respectivamente, en sujetos con sobrepeso tras consumir durante 12 semanas el producto comercial Coffee Slender, que aportaba entre 330-440 mg de derivados hidroxycinámicos, atribuyendo principalmente a los polifenoles el efecto adelgazante observado (Thom, 2007). En otro estudio, voluntarios con sobrepeso que consumieron un extracto de café verde durante 6 semanas mostraron un efecto dosis-dependiente en la pérdida de peso, con reducciones de hasta 1,5 kg de peso tras el consumo regular de 700 mg diarios de derivados hidroxycinámicos, y de 2 kg de peso cuando la ingesta de estos polifenoles se elevaba a 1050 mg/día (Vinson y cols., 2012). En nuestro estudio, la ingesta del producto de café mezcla tostado/verde, que aportaba una dosis diaria de derivados hidroxycinámicos (496 mg) menor que en los citados estudios, también mostró un efecto adelgazante del orden de 1 kg tras 8 semanas, lo que hace pensar en el efecto conjunto de los polifenoles y la CF (dosis consumida 212,1 mg/día). Además, es de destacar que en los voluntarios hipercolesterolémicos se observa un descenso de 1,2 cm en la circunferencia de la cintura, siendo éste un importante biomarcador de riesgo cardiovascular.

Reincidiendo sobre el efecto saciante que presentan las bebidas que contienen CF (Kovacs y cols., 2004; Westerterp-Plantenga y cols., 2005), se ha descrito que al

suplementar con 6 mg de CF por kg de peso la dieta de dos poblaciones de sujetos, una con normopeso (peso medio 64 kg) y la otra con sobrepeso (peso medio 88 kg), se observó una menor ingesta calórica sólo en el grupo de sujetos con sobrepeso, quienes además no expresaron sentir una mayor sensación de apetito durante el estudio (Gavrieli y cols., 2013). En nuestro estudio, la mezcla de café tostado/verde aportaba menores dosis de CF (212,1 mg diarios, equivalente a 3,4 mg/kg de peso) y no se estudiaron a través de un cuestionario los posibles cambios en el apetito, pero, atendiendo a las ingestas estimadas a partir de los registros dietéticos, el consumo de la mayoría de nutrientes no se modificó a lo largo del estudio, con excepción de las proteínas. En este sentido, la grelina, hormona gastro-intestinal secretada para estimular el apetito al inicio de las comidas, juega un papel importante en la regulación de la ingesta (Cummings y cols., 2001). Así, cuando se administró grelina por vía intravenosa a un grupo de sujetos adultos, 3 de cada 4 incrementaban la sensación de apetito (Arvat y cols., 2000). En nuestro estudio, los niveles de grelina determinados en las muestras de sangre en ayunas tras la intervención con café fueron menores en ambos grupos de voluntarios, por lo que el consumo regular de café podría incrementar la saciedad y disminuir el apetito, lo que resultaría en una menor secreción de grelina. Sin embargo, nuestros resultados de grelina discrepan con los de un estudio agudo en los que la ingesta diaria de 3 mg de CF por kg de peso en un grupo de sujetos sanos con ligero sobrepeso (IMC medio = 25,5 kg/m²) no produjo modificaciones en los niveles de grelina (Gavrieli y cols., 2011). Aparte del efecto saciante de la CF, esta metilxantina puede actuar en el sistema nervioso simpático incrementando el gasto energético (Greenberg y cols., 2006), por lo que es posible que la ingesta diaria de CF también contribuyera a la pérdida de peso corporal a través del incremento de gasto energético. Atendiendo a los cuestionarios de actividad física, los voluntarios no variaron su actividad física a lo largo del estudio, por lo que se descarta que ésta sea la causa de la pérdida de peso observada.

Los adipocitos participan en la respuesta inflamatoria secretando las adipoquinas pro-inflamatorias leptina, resistina y visfatina, así como adiponectina, siendo esta última anti-inflamatoria. Estas citoquinas también están implicadas en el control del peso corporal (Kalupahana y cols., 2012). A pesar de la extensa bibliografía que existe sobre el papel de los adipocitos en procesos de obesidad (revisada en Cao, 2014), la influencia del consumo de café en la regulación de adipoquinas ha sido poco estudiada. Algunos autores confirman que se produce el aumento de adiponectina tras la ingesta de café. Entre ellos, Kempf y colaboradores (2010) observaron esta tendencia en sujetos sanos al ingerir 4 tazas diarias de café (datos de composición no proporcionados) durante 2 meses. De manera similar, Williams y colaboradores (2008) también encontraron mayores niveles de esta adipoquina tanto en mujeres sanas como en diabéticas que tomaban más de 4 tazas diarias de café. En cuanto a la leptina, se ha descrito una menor secreción en humanos con sobrepeso (IMC medio = 27,5 kg/m²) asociada a la ingesta de

150 mg de CF mezclada con té verde durante 3 meses, produciéndose una pérdida de peso que también se relacionó con la termogénesis y la oxidación lipídica (Westerterp-Plantenga y cols., 2005). Resultados similares se han observado en ratones sometidos a una dieta suplementada con ácido clorogénico y ácido cafeico (Cho y cols., 2010). Según estos dos últimos estudios, las metilxantinas y los polifenoles están implicados en la regulación de leptina. En un meta-análisis reciente de estudios llevados a cabo en individuos sanos con peso normal que mantuvieron sus ingestas habituales de café durante el estudio, aquellos que consumían más de 4 tazas diarias mostraron menores niveles de leptina en plasma que aquellos que ingerían menores cantidades de café (Yamashita y cols., 2012).

Otras adipoquinas pro-inflamatorias que pueden haber jugado un papel en la reducción del peso y del porcentaje de grasa corporal observados en nuestros voluntarios son PAI-1 y resistina. El incremento de PAI-1 en sangre ha sido asociado con disfunción endotelial (Cines y cols., 1998), así como con una mayor acumulación de grasa abdominal en mujeres post-menopáusicas (Meilahn y cols., 1996). Otros autores (Tsioufis y cols., 2006) sugieren una asociación positiva entre el consumo de café y los niveles de PAI-1 en sujetos normopeso, fumadores e hipertensos, de forma que los voluntarios que ingerían más de 4 tazas diarias de café (aproximadamente, 90 mg de CF por taza) presentaban mayores niveles de PAI-1 que aquellos que ingerían 1 taza diaria. Sin embargo, recientemente se ha descrito en un grupo de sujetos sanos con IMC < 25 kg/m² una relación inversa entre el consumo de café y los niveles de leptina y PAI-1, siendo aquellos sujetos que consumían entre 2 y 4 tazas diarias de café (aproximadamente, 60 mg de CF por taza) los que presentaban menores niveles de estas adipoquinas (Pham y cols., 2014). Con respecto a la relación de la ingesta de café con los niveles de resistina, estos mismos autores observaron una mayor expresión de esta adipoquina únicamente en hombres fumadores. En nuestro estudio, el consumo regular de 3 tazas diarias de café tostado/verde, que aportaban diariamente 496 mg de derivados hidroxycinámicos y 212,1 mg de CF, mostró un resultado beneficioso en sujetos sanos e hipercolesterolémicos, ambos normopeso, normotensos y no fumadores, produciendo un descenso significativo en los niveles de leptina, PAI-1 y resistina, el peso corporal y el porcentaje de grasa.

5.3.2.2.2. Presión arterial y frecuencia cardiaca

Aunque el café ha sido tradicionalmente considerado un alimento que incrementa el riesgo de padecer hipertensión (Lane y cols., 2002), estudios recientes demuestran que los efectos negativos del café en la PA difieren según se trate de un consumo agudo o crónico (Riksen y cols., 2009). El aumento de la tensión arterial se produce durante las tres horas siguientes a la ingesta de café (Mesas y cols., 2011); sin embargo, este

aumento se produce principalmente en sujetos que no consumen esta bebida de forma habitual. Por el contrario, los consumidores habituales de café, con ingestas superiores a 3 tazas diarias, no sufren este efecto hipertensivo (Zhang y cols., 2011). Estas diferencias se explican por la tolerancia adquirida a los componentes del café tras 3-5 días de consumo (Armstrong y cols., 2005). El efecto del consumo de café podría además estar relacionado con las condiciones fisiológicas de los individuos que lo consumen. Un grupo de sujetos normotensos rebajaron entre 3-4 mm Hg la PA sistólica y diastólica tras consumir un extracto de café verde (140 mg diarios de ácido clorogénico) durante 4 meses (Ochiai y cols., 2004). El efecto fue similar en sujetos ligeramente hipertensos, quienes tras la ingesta diaria de 46, 93 y 185 mg de otro extracto de café verde (25, 50 y 100 mg diarios de ácido clorogénico) durante 28 días, redujeron la PA con las dos dosis mayores en torno a 3-5,5 mm Hg, observándose además un efecto dosis-dependiente (Kozuma y cols., 2005), lo que sugiere un efecto más acusado en sujetos de mayor riesgo cardiovascular. En nuestro estudio, la mayoría de voluntarios eran consumidores habituales de café y todos eran normotensos desde el inicio hasta el final del estudio, pero la PA sistólica se redujo con respecto a la situación basal en 3,4 y 5,3 mm Hg en los grupos normo e hipercolesterolémico, respectivamente, como consecuencia del consumo regular de un producto de café mezcla tostado/verde (151 mg de ácido clorogénico), mientras que la PA diastólica lo hizo en 2,3 y 5,6 mm Hg en sanos e hipercolesterolémicos, respectivamente.

Los efectos del consumo agudo o crónico de café en la PA han sido asociados a su contenido en CF. Aunque los mecanismos a través de los cuales la CF ejerce su papel hipertensor no son todavía bien conocidos, cabe destacar que esta metilxantina es un antagonista de la adenosina, cuyo bloqueo provoca vasoconstricción (James, 1997). En estudios agudos, la ingesta de 200-300 mg de CF parecía tener un efecto agudo sobre la PA sistólica y diastólica, incrementándolas en 8,1 y 5,7 mm Hg, respectivamente (Mesas y cols., 2011), mientras que en otro estudio se ha observado una total tolerancia a los efectos de la CF sin afectar a la PA de un grupo de consumidores habituales de café cuando la dosis de esta metilxantina alcanzaba los 200 mg (McMullen y cols., 2011). Sin embargo, mientras algunos autores no observaron un efecto hipertensivo con café descafeinado (Buscemi y cols., 2010), otros describieron un aumento de la PA tanto con café cafeinado como descafeinado (Corti y cols., 2002). Atendiendo a estos resultados, la CF no parece ser el único componente del café responsable del posible efecto hipertensor de esta bebida.

El café es un alimento rico en polifenoles, principalmente derivados hidroxicinámicos, que participan en la correcta función endotelial (Mubarak y cols., 2012). Por el contrario, la hidroxihidroquinona (HHQ), que se forma durante el tostado de los granos de café, favorece la producción de ROS, inhibiendo además el papel cardioprotector de los polifenoles (Suzuki y cols., 2002). Se ha observado un efecto

dosis-dependiente entre la PA y los derivados hidroxicinámicos. Cuando un grupo de sujetos medianamente hipertensos consumieron durante 4 semanas distintas dosis de derivados hidroxicinámicos (82, 172 y 300 mg) en un producto de café libre de HHQ, con un contenido en CF de 75-81 mg, las tres dosis de fenoles redujeron la PA, siendo el efecto más pronunciado con la dosis más alta (hasta 3,3 y 2,8 mm Hg menos de PA sistólica y diastólica, respectivamente) (Yamaguchi y cols., 2008).

El café verde contiene una mayor proporción de derivados hidroxicinámicos y una menor concentración de HHQ que el tostado. Un extracto de café verde ha mostrado reducir la PA de ratas hipertensas, que paralelamente aumentaron sus concentraciones plasmáticas de 5-CQA (Suzuki y cols., 2002). En un grupo de sujetos con hipertensión media, tras 8 semanas de consumo de un extracto de café verde conteniendo 300 mg de derivados hidroxicinámicos y 0,03 mg de HHQ se reducía la PA sistólica en 9,2 mm Hg (Ochiai y cols., 2009). Teniendo en cuenta la absorción y metabolización del 5-CQA en humanos, es posible que los ácidos cafeico o ferúlico sean los compuestos responsables del efecto hipotensor (Suzuki y cols., 2006), junto a otros metabolitos circulantes procedentes de los derivados hidroxicinámicos tales como el ácido dihidrocafeico, que puede captar los ROS generados en el endotelio y favorecer la actividad de la eNOS (Huang y cols., 2004), y los ácidos dicafeoilquínicos, que pueden inhibir la molécula vasoconstrictora angiotensina II (Chiou y cols., 2009). Estos metabolitos, que alcanzan la mayor absorción plasmática entre las 4 y las 8 h tras la ingesta de café (Stalmach y cols., 2009; Renouf y cols., 2010a) podrían contribuir a un efecto en la PA más prolongado en el tiempo.

El producto de café empleado en el presente estudio, con un aporte de 496 mg diarios de derivados hidroxicinámicos, parece ser responsable de los menores niveles de PA observados tanto en voluntarios sanos como en voluntarios susceptibles de riesgo cardiovascular. No se puede descartar que el efecto hipotensor hubiera sido más acusado si los voluntarios de este estudio hubieran sido hipertensos. Además, teniendo en cuenta que un descenso en la PA de 2-5 mm Hg supone un 14% menos de riesgo de infarto y entre un 8-9% menos de posibilidades de padecer enfermedades coronarias (Kozuma y cols., 2005), se puede concluir que el producto de café aquí estudiado produce un efecto cardioprotector, sobre todo en sujetos hipercolesterolémicos.

5.3.2.2.3. Lipemia

El primer estudio clínico que constató el efecto del café sobre el perfil lipídico data de 1985. Hombres hipercolesterolémicos (n=33) redujeron sus niveles séricos de CT tras un periodo de abstinencia de café y mantuvieron tal reducción al consumir café filtrado; sin embargo, los mismos sujetos recuperaron sus niveles iniciales de CT al consumir café

hervido (Forde y cols., 1985). Estos resultados sugerían que la forma de preparación de la bebida podría ser determinante en la acumulación de lípidos séricos.

Entre los componentes bioactivos del café, los diterpenos kahweol y cafestol son responsables del efecto hiperlipemiente, favoreciendo la acumulación de CT y la menor actividad de los receptores de LDL en la célula (Nawrot y cols., 2003; Urgert & Katan, 1997). La concentración de diterpenos varía según el modo de preparación de la bebida, de forma que el café filtrado pierde gran parte de su contenido en diterpenos al quedar éstos retenidos en el papel de filtro (Hammar y cols., 2003). Un meta-análisis de los efectos del café en los lípidos séricos mostró que el consumo de café hervido incrementaba los niveles de CT y LDL-C en 23 y 14 mg/dL, respectivamente, mientras que el efecto del café filtrado en estos dos biomarcadores era prácticamente nulo, siendo además estas tendencias más acusadas en los sujetos con elevados niveles de colesterol en sangre (Jee y cols., 2001). Aunque un estudio de cohorte ha encontrado una asociación nula entre la ingesta habitual de café filtrado en individuos sanos y sus niveles de CT, LDL-C y HDL-C (López-García y cols., 2006b), en algunas revisiones otros autores advierten que los efectos adversos podrían minimizarse al reducir la ingesta de diterpenos, permitiendo además a los polifenoles presentes en el café ejercer su acción hipolipemiente en mayor medida (Bonita y cols., 2007; Higdon y Frei, 2006). Cuando Van Rooij y colaboradores (1995) compararon en un grupo de voluntarios sanos el efecto de consumir 2 g de un extracto de aceite de café Arábica y Robusta, observaron un efecto hiperlipemiente con ambas variedades; sin embargo, el incremento en los niveles de CT, LDL-C, TG y ApoB fue menor cuando los voluntarios ingerían el aceite de la variedad Robusta. Aunque la concentración de diterpenos en el producto de café mezcla tostado/verde empleado en nuestro estudio no ha sido evaluada, al tratarse de un producto de café instantáneo de la variedad Arábica cabría esperar entre 0,2 y 18 mg/100 mL de diterpenos (Bonita y cols., 2007). Sin embargo, al contener un 35% de café verde, su elevada composición en derivados hidroxicinámicos, especialmente en ácido clorogénico (151 mg diarios), podría contrarrestar los efectos adversos de los diterpenos y justificaría así el descenso observado en los niveles de CT, LDL-C, VLDL-C y TG de 21, 19, 4,8 y 20,4 mg/dL, respectivamente, en el grupo de voluntarios hipercolesterolémicos. Estos resultados están en línea con los observados en un grupo de sujetos ligeramente hipercolesterolémicos, quienes tras la ingesta de 50 y 100 mg diarios de 5-CQA en un extracto de café verde, mostraron una reducción en las concentraciones de CT de entre 8-10 mg/dL y de LDL-C entre 3,5-5,5 mg/dL (Kozuma y cols., 2005).

Si bien en nuestro estudio no se observaron cambios significativos en la concentración de HDL-C, se produjo un incremento del 4% en sus niveles en el grupo de voluntarios sanos. Estos resultados son muy similares a los observados en un grupo de sujetos ligeramente hipertensos quienes aumentaban sus niveles de HDL-C, aunque no

de forma significativa, en casi un 4% tras 8 semanas bebiendo un producto de café soluble sin filtrar que aportaba 300 mg diarios de derivados hidroxicinámicos (Ochiai y cols., 2009). Igualmente, nuestros resultados están en consonancia con el efecto hipolipémico descrito en voluntarios sanos en los que los niveles de HDL-C se incrementaban un 7% tras consumir de forma regular 8 tazas diarias de café filtrado (composición no proporcionada) (Kempf y cols., 2010). Uto-Kondo y colaboradores (2010) observaron un incremento en los niveles de los ácidos cafeico y ferúlico, entre otros, acompañado de un aumento en los niveles de HDL-C, lo que podría explicar la implicación de estos compuestos en el efecto hipolipémico tras la ingesta de derivados hidroxicinámicos.

Por otro lado, se ha descrito que el consumo de café puede producir cambios a nivel hepático, y que una ingesta mayor o igual a 3 tazas diarias reduce los niveles de las enzimas transaminasas, siendo significativo en el caso de AST (Casiglia y cols., 1993). En nuestro estudio, no se han observado cambios en las enzimas transaminasas que estaban en el rango de la normalidad (inferior a 45 UI/L) a lo largo de todo el estudio.

5.3.2.2.4. Inflamación

Los estudios existentes hasta la fecha sobre el efecto del café y sus componentes en inflamación son escasos y controvertidos.

El estudio observacional ATTICA evaluó el posible efecto anti-inflamatorio del café en sujetos sanos que no consumían café y en personas que habitualmente consumían menos de 200 mL, 200-400 mL o más de 400 mL diarios, concluyendo que aquellos que ingerían las mayores cantidades presentaban niveles de PCR un 30% superiores a aquellos que bebían menos de 200 mL de café, sugiriendo por tanto un efecto pro-inflamatorio (Zampelas y cols., 2004). En un estudio llevado a cabo en sujetos sanos, los niveles de esta proteína no variaron cuando los sujetos consumían 4 y/o 8 tazas diarias de café filtrado, aunque los niveles eran ligeramente menores durante la intervención con la menor ingesta (Kempf y cols., 2010). De manera similar, otros autores han encontrado una asociación nula entre los niveles circulantes de este biomarcador y el consumo habitual de café en sujetos sanos (Rebello y cols., 2011). Por el contrario, en el presente estudio se observó un importante descenso en los niveles de PCR tanto en sujetos sanos como en el grupo hipercolesterolémico. En algunos estudios de intervención también se han referido efectos beneficiosos sobre los niveles de esta proteína de fase aguda asociados al consumo de café. Así, en un grupo de sujetos con trastorno coronario también se observó un descenso de PCR 1 h después de ingerir 200 mg de CF pura (Shechter y cols., 2011), por lo que es posible que las metilxantinas

jueguen un papel en este efecto anti-inflamatorio. Según López-García y colaboradores (2006a), el consumo crónico de más de 1 taza diaria de café cafeinado reducía los niveles de PCR en mujeres diabéticas; sin embargo, en mujeres sanas estos efectos únicamente fueron observados con café descafeinado y filtrado, sugiriendo que la CF, los diterpenos y los compuestos fenólicos participan en el efecto del café sobre la PCR. Además, los niveles de esta proteína de fase aguda se han asociado con el peso corporal y el IMC en el mismo sentido que lo observado en nuestro estudio, con reducciones significativas tanto del peso como del IMC en ambos grupos de voluntarios relacionadas con el descenso en los niveles de PCR (Tchernof y cols., 2002).

Por otro lado, algunos estudios sugieren una menor inflamación sub-clínica asociada al consumo de café (revisado en Andersen y cols., 2006; Bonita y cols., 2007). Considerando a los polifenoles, especialmente ácidos fenólicos y derivados hidroxycinámicos, y las melanoidinas como principales componentes anti-inflamatorios, Vitaglione y colaboradores (2010) llevaron a cabo un estudio en animales cuya dieta fue suplementada con café descafeinado y filtrado o con un extracto de polifenoles o de melanoidinas del propio producto de café, observando que los niveles plasmáticos de las interleuquinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 aumentaban tras la administración de los tres suplementos dietéticos. Estos resultados sugerían que los efectos se debían tanto a los polifenoles como a las melanoidinas contenidas en el café, descartando la implicación de la CF en un efecto protector. No obstante, la absorción de melanoidinas, compuestos poliméricos de alto peso molecular, aún no ha sido bien clarificada en humanos. Además, la mayoría de estudios *in vitro* han usado los compuestos puros, por lo que es difícil establecer el papel de estos componentes en humanos cuando son ingeridos en el café (Ludwig y cols., 2014).

En el estudio llevado a cabo en la presente Tesis, el efecto derivado del consumo regular y moderado del producto de café mezcla tostado/verde provocó una tendencia a aumentar los niveles de IL-4, IL-10 e IL-13 en el grupo de voluntarios susceptibles de riesgo cardiovascular. Estos resultados estaban en consonancia con la mayor expresión de IL-10 observada en pacientes con aterosclerosis con respecto a sujetos sanos, sugiriendo que esta citoquina podría estar elevada en casos de riesgo como respuesta anti-inflamatoria (Lakoski y cols., 2008). La ingesta diaria de 496 mg de derivados hidroxycinámicos con el producto de café mezcla tostado/verde podría contribuir a la tendencia anti-inflamatoria observada. La composición de melanoidinas del producto de café empleado en nuestro estudio no ha sido analizada. Fogliano y Morales (2011) cuantificaron hasta 22,8 g de melanoidinas/100 g de café tostado soluble. Atendiendo a este resultado, el producto empleado en nuestro estudio, que contenía un 65% de café tostado, podría suponer una ingesta diaria de 1,6 g de melanoidinas, que, junto con los polifenoles, también podrían contribuir a un ligero efecto anti-inflamatorio en el grupo hipercolesterolémico mediado por las células Th 2 y las células T reguladoras.

Junto a la proteína de fase aguda PCR, las interleuquinas de activación general (IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α) son los principales marcadores implicados en la respuesta inflamatoria, de forma que un incremento en sus niveles plasmáticos evidencian un riesgo de ECV (Ridker y cols., 2000a; 2000b). Diversos estudios en animales confirman la influencia del café y sus componentes en la regulación de estos biomarcadores. Así, se observaron menores niveles de IL-1 β en hígado de ratas cuya dieta se suplementó con café cafeinado y café descafeinado (Fukushima y cols., 2009), o de IL-6 en suero de ratas alimentadas con CF pura (Yamauchi y cols., 2010); sin embargo, los escasos resultados en humanos hasta la fecha no son concluyentes. A pesar de los ya mencionados beneficios del café filtrado y de los polifenoles en lipemia, Corrêa y colaboradores (2013) observaron que el consumo regular durante 4 semanas de dos productos de café filtrado con diferentes grados de tostado producía un efecto hiperlipémico con mayores niveles de CT y LDL-C en sujetos sanos con un ligero sobrepeso (IMC = 27 kg/m²), acompañado de un mayor estado inflamatorio al aumentar los niveles de las citoquinas de activación general. En cambio, otros autores no encuentran un claro efecto en consumidores habituales sanos tras ingerir 4 u 8 tazas de café filtrado (Kempf y cols., 2010), ni en mujeres diabéticas que consumían esta bebida de forma frecuente (Williams y cols., 2008). En el presente estudio, el consumo regular del producto de café mezcla tostado/verde no produjo cambios significativos en los niveles plasmáticos de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , aunque se apreció una tendencia a reducir la expresión de estos marcadores en el grupo de voluntarios sanos. Por el contrario, el efecto del café en la interleuquina IL-2 ha sido escasamente evaluado hasta la fecha. Esplenocitos del bazo incubados con un extracto de café reducían significativamente la expresión de esta citoquina sugiriendo un efecto anti-inflamatorio (Goto y cols., 2010).

La respuesta inmunitaria adaptativa desencadena la liberación de citoquinas en las células colaboradoras Th y las células reguladoras T. En las células Th1, la síntesis de IL-12 ha mostrado ser un potente inductor de IFN- γ (Wenner y cols., 1996). Los niveles de IFN- γ en animales se reducían como consecuencia de la ingesta de café (Fukushima y cols., 2009) y/o de melanoidinas (Vitaglione y cols., 2010); sin embargo, en nuestro estudio el consumo regular del producto de café tostado/verde no mostró ningún efecto sobre los niveles de estas dos citoquinas. Aunque se ha considerado que la citoquina inmunosupresora IL-4 es la principal reguladora de la respuesta de las células Th2, sus carencias son compensadas por la interleuquina pro-inflamatoria IL-5 (Fallon y cols., 2002); no obstante, esta citoquina pro-inflamatoria tampoco se vio afectada por el consumo del producto de café mezcla tostado/verde.

De acuerdo con Wong y colaboradores (2001), la IL-17 es capaz de inducir la síntesis de citoquinas de activación general, como la IL-6, y de citoquinas estimulantes hematopoyéticas, como el GM-CSF. Ningún estudio ha evaluado hasta la fecha la influencia del café o de sus componentes bioactivos en la regulación de IL-17, de GM-

CSF y de otros factores hematopoyéticos pro-inflamatorios como la IL-7 o el G-CSF. Aunque en nuestro estudio el café mezcla tostado/verde no produjo ningún efecto sobre estas citoquinas, cabe mencionar una tendencia general a reducir sus niveles únicamente en el grupo de voluntarios normocolesterolémicos.

La quimioquina MCP-1, producida principalmente en macrófagos y células endoteliales, es una potente citoquina quimiotáctica cuya sobreexpresión ha sido observada en el desarrollo de la placa aterosclerótica (Rus y cols., 1996) y en pacientes con enfermedad coronaria (Koh y cols., 2005). En la revisión de Frost-Meyer y Logomarsino (2012) se sugería la implicación de trigonelina y kahweol en la expresión de MCP-1 mientras que otros autores han asociado la mayor expresión de esta quimioquina a la CF (Fukushima y cols., 2009). En contra de estas observaciones, un estudio en ratas alimentadas tanto con café como con CF pura mostró una reducción de MCP-1 en suero y en tejido adiposo (Yamauchi y cols., 2010). Además, tras la ingesta de vino tinto, un grupo de sujetos sanos mostraron una tendencia a reducir los niveles de MCP-1, probablemente debido al elevado contenido en polifenoles de esta bebida (Estruch y cols., 2004). En el presente estudio, se observó una asociación nula entre el consumo de café y los niveles de esta quimioquina, aunque las tendencias apuntaban a un descenso en el grupo de voluntarios sanos.

Por otro lado, la acumulación de lípidos séricos en las células vasculares favorece la expresión de moléculas de adhesión sICAM-1 y sVCAM-1 en los leucocitos, aumentando así la adhesión de monocitos y su transferencia a la íntima, donde se diferenciarán en los macrófagos (Pan y cols., 2010). En células endoteliales humanas incubadas con kahweol se observó una atenuación de la secreción de las moléculas de adhesión inducida por TNF- α (Kim y cols., 2006). Además, el ácido clorogénico, principal compuesto fenólico del café, mostró un efecto similar en células endoteliales vasculares, lo que podría ser explicado por una inhibición de la producción de ROS y, por tanto, una menor activación de las moléculas de adhesión mediada por NF- κ B (Chang y cols., 2010; Tangney & Rasmussen, 2013). En el presente estudio, ni el contenido en diterpenos ni la composición en polifenoles del café parecían influir en la expresión de sICAM-1 y sVCAM-1, aunque es de destacar una tendencia a reducir la expresión de ambas moléculas de adhesión, principalmente en el grupo de voluntarios sanos.

En resumen, el consumo de café podría tener un efecto anti-inflamatorio. Sin embargo, atendiendo a la variabilidad de resultados en la respuesta inflamatoria y a la escasa información sobre la influencia de los componentes del café en los niveles de algunas citoquinas inflamatorias, sería necesaria una investigación más amplia en este campo con objeto de esclarecer el efecto del café en la inflamación sub-clínica y establecer la implicación de sus componentes y metabolitos.

5.3.2.2.5. Estado Oxidativo

El café tostado, junto con el té y el cacao, es una bebida que presenta destacables propiedades antioxidantes gracias a su elevado contenido polifenólico. Por lo tanto, esta propiedad es todavía más destacable cuando se trata de café verde o café ligeramente tostado por su mayor concentración en fenoles (Richelle y cols., 2001). Atendiendo a las evidencias científicas obtenidas en estudios *in vitro* y en animales de experimentación, el café tiene un potencial efecto protector en enfermedades en las que el estrés oxidativo y el daño a macromoléculas forman parte de la patogénesis (Esposito y cols., 2003). En humanos, el café ha demostrado ser el alimento que más contribuye al aumento de la CAO en suero, en comparación con el té, el vino, las frutas y los vegetales, de acuerdo con los resultados medidos a través del método FRAP (Svilaas y cols., 2004). La capacidad antioxidante del café ha sido atribuida tanto a la captación directa de radicales libres como a la inducción de enzimas antioxidantes por parte de los polifenoles (Natella y cols., 2002).

El ácido cafeico alcanza su máxima concentración plasmática (C_{\max} = 21 ng/mL) 1 h tras la ingesta de 96 mg de ácido clorogénico en una infusión de café tostado (Nardini y cols., 2002). Esto podría explicar además el elevado poder antioxidante medido a través del método FRAP en muestras de suero postprandiales obtenidas tras el consumo de café (Moura-Nunes y cols., 2009). Sin embargo, los efectos del consumo crónico de café sobre el estado oxidativo en humanos han sido menos investigados. En el presente estudio, tras el consumo regular del producto de café empleado, que aportaba diariamente 151 mg de ácido clorogénico, la CAO en el suero de los voluntarios en ayunas aumentó con respecto a las etapas basal y control en ambos grupos de voluntarios, apuntando claramente a una consecuencia del consumo de café. La CAO se midió por dos métodos complementarios: FRAP, como método para valorar el poder reductor, y ORAC, para evaluar la capacidad de captación de radicales libres, aumentando ambos parámetros tras la intervención con café con respecto a la situación basal en los voluntarios normo e hipercolesterolémicos, en un 5,4 y 8,7%, respectivamente, cuando fue medido por FRAP (Figura 21B) y en un 11,1 y 15,6%, respectivamente, cuando fue medido por ORAC (Figura 21A).

Es bien conocido que en el desarrollo de patologías cardiovasculares la oxidación de las lipoproteínas LDL por los radicales libres juega un papel muy importante, pero los ROS también pueden reaccionar con los lípidos sanguíneos, pudiéndose evaluar el daño lipídico a través de distintos biomarcadores como los F2-isoprostanos, 4-hidroxi-2-nonenal, o el MDA, habiéndose demostrado en un estudio intercomparativo que este último biomarcador es el más sensible y reproducible (Breusing y cols., 2010). En un trabajo reciente, el consumo durante 5 días de un producto de café soluble conteniendo semillas tostadas y verdes que aportaba un total de 1200 mg diarios de derivados

hidroxicinámicos dio lugar a una reducción de los niveles séricos de MDA de un 8% con respecto al consumo de agua por el mismo periodo de tiempo (Hoelzl y cols., 2010). En comparación, el producto de café mezcla tostado/verde empleado en esta Tesis Doctoral aportó 496 mg/día de derivados hidroxicinámicos a lo largo de 8 semanas e indujo una mayor protección frente al daño oxidativo de los lípidos, atendiendo a los niveles séricos de MDA que disminuyeron en un 9-16% con respecto a la situación basal y la etapa control (Figura 22A). En comparación con los resultados de Hoelzl y colaboradores (2010), el mayor efecto observado en nuestro estudio podría deberse al consumo más prolongado en el tiempo. Estos resultados coinciden además con los de otros autores que han descrito una disminución en la oxidación lipídica en sujetos sanos, medido también a través del biomarcador MDA en suero, tras el consumo de 24 g diarios de café tostado de la variedad Arábica (dato de composición en derivados hidroxicinámicos no proporcionado) durante una semana (Yukawa y cols., 2004).

Por otro lado, los ROS pueden inducir la oxidación de proteínas séricas e implicar un mayor riesgo de padecer enfermedades como la arterioesclerosis, la diabetes tipo 2 o el Alzheimer (Ichihashi y cols., 2001; Dalle-Donne y cols., 2003). Hasta donde sabemos, la protección frente al daño a proteínas séricas tras el consumo de café no ha sido evaluada anteriormente y estos son los primeros resultados al respecto. Tras el consumo regular y moderado del producto de café empleado en el presente estudio, la concentración de GC se redujo en torno a un 30% (Figura 22B) con respecto a la situación basal en ambos grupos de voluntarios, apuntando una vez más al efecto protector de esta bebida frente al desarrollo de enfermedades con un componente oxidativo.

Los resultados de este estudio muestran que el consumo regular y moderado del producto soluble de café mezcla tostado/verde, con un elevado contenido en derivados hidroxicinámicos, mejora la capacidad de captación de radicales libres y la capacidad reductora del suero tanto en sujetos sanos como hipercolesterolémicos, reduciendo la oxidación de lípidos y proteínas. Aunque los efectos antioxidantes del café son mayoritariamente asociados a los polifenoles, otros componentes bioactivos presentes en esta bebida podrían contribuir al efecto protector frente al daño oxidativo, como la CF (Azam y cols., 2003; Gómez-Ruiz y cols., 2007), que con el producto de café aquí estudiado aportaba 212,1 mg/día, no pudiéndose descartar la posible contribución de las melanoidinas presentes en el 65% de café tostado (Morales y cols., 2012) o incluso que se haya podido dar un efecto sinérgico entre estos componentes bioactivos del café.

5.3.2.2.6. Glicemia y resistencia a la insulina

Estudios epidemiológicos apoyan que el café juega un papel protector frente a la diabetes tipo 2, hasta el punto de que por cada taza de café adicional disminuye el riesgo de diabetes en un 7% (revisado en Huxley y cols., 2009). Este efecto ha sido atribuido a su alto contenido en antioxidantes (Cano-Marquina y cols., 2013), que puede disminuir el estrés oxidativo como estado que predispone a desarrollar la resistencia a la insulina (Henriksen y cols., 2011), lo que se traduce en una menor sensibilidad o respuesta a la acción metabólica de esta hormona en tejidos diana como músculo, tejido adiposo e hígado, empeorando la tolerancia a la glucosa. Además de los efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo en general, protegiendo también a la propia célula β -pancreática (Fernández-Millán y cols., 2014), los compuestos polifenólicos pueden mejorar el metabolismo de la glucosa actuando directamente sobre la gluconeogénesis, hormonas digestivas o la microflora intestinal (Tunnicliffe y cols., 2008). El ácido clorogénico del café puede actuar sobre la glucosa-6-fosfatasa (van Dam, 2006) inhibiendo de manera competitiva la actividad de esta enzima y la de la glucosa-6-fosfato translocasa, siendo ambas enzimas clave en la homeostasis glucídica hepática (Higdon y Frei, 2006; Arion y cols., 1997). Por otra parte, los ácidos hidroxicinámicos del café pueden disminuir los niveles plasmáticos de GIP y aumentar los de GLP-1, incidiendo así sobre la secreción de insulina y la absorción intestinal de glucosa (Johnston y cols., 2003). Además, se ha demostrado que bebidas ricas en derivados hidroxicinámicos son capaces de reprimir la expresión de SGLT, el principal transportador de glucosa en el epitelio intestinal (Oliveira y cols., 2008). Otro posible mecanismo de acción de los compuestos fenólicos del café es la inhibición la α -amilasa pancreática (Narita y cols., 2009) disminuyendo la digestibilidad del almidón de la dieta y reduciendo el índice glicémico. A través de alguno(s) de estos mecanismos, los derivados hidroxicinámicos del producto de café mezcla tostado/verde actuaron disminuyendo la concentración de glucosa en ayunas en los dos grupos de estudio y redujeron los niveles de insulina en el grupo normocolesterolémico (no llegando a ser estadísticamente distintos) sin producir cambios en el grupo de riesgo.

Teniendo en cuenta estos valores de glucosa e insulina en ayunas, se estimaron los posibles cambios sobre la sensibilidad tisular a la insulina y la función de las células β pancreáticas a través de los índices HOMA-IR y HOMA- β , respectivamente, y se determinó la sensibilidad a la insulina mediante el cálculo del índice QUICKI, en el que se aplica la transformación logarítmica de la insulina y la glucosa, evitando así el posible error que deriva de la distribución sesgada de la insulina (Katz y cols. 2000). En ambos grupos se observó un aumento en la sensibilidad a la insulina y la proliferación de células β , así como la disminución de la resistencia a la insulina.

La asociación inversa entre el consumo de café y los menores niveles de HOMA-IR observada en el presente estudio apoya los resultados de trabajos anteriores (Agardh y cols. 2004; van Dam y cols., 2004; Rebello y cols. 2011). En este mismo sentido, nuestros resultados obtenidos en individuos normopeso con un IMC < 25 kg/m² (Tabla 18) también apuntan a los referidos en un estudio transversal reciente llevado a cabo en 1542 hombres, en el que también se observó que el consumo de café estaba inversamente asociado con el índice HOMA-IR en el subgrupo de hombres no obesos, pero no en el de los obesos (IMC ≥ 25 kg/m²) (Otake y cols., 2014). Además, en el presente estudio se observó un incremento significativo en la sensibilidad a la insulina estimada mediante el modelo QUICKI, en concordancia con estudios previos (Ärnlöv y cols., 2004; Loopstra-Masters y cols., 2011), efecto que fue más acusado en el grupo normocolesterolémico. Sin embargo, estos efectos positivos no se tradujeron en una disminución significativa de los niveles de insulina en ayunas, en concordancia con otros ensayos clínicos con café publicados previamente (Moisey y cols., 2008; Wedick y cols., 2011; Krebs y cols., 2012; Ohnaka y cols., 2012).

Otros componentes bioactivos del café, como la CF y el magnesio (Clifford, 2000) pueden haber participado en los efectos observados sobre la sensibilidad a la insulina y los niveles de glucosa en ayunas. Existe la paradoja de que el consumo de CF o de café cafeinado produce un efecto marcado de resistencia a la insulina en sujetos no consumidores de esta bebida, si bien el consumo habitual de café reduce el riesgo de diabetes tipo 2 (Agardh y cols., 2004; Moisey y cols., 2008; Huxley y cols., 2009; Akash y cols., 2014). Evidencias científicas apoyan que la CF reduce la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético debido a la acción antagónica de receptores A1 y de la estimulación β -adrenérgica (Beaudoin y Graham, 2011). Se ha descrito además que la CF induce un empeoramiento en la tolerancia a la glucosa y disminuye la sensibilidad tisular de la insulina en personas sanas (Keijzers y cols., 2002; Higdon y Frei, 2006; Tunnicliffe y cols., 2008). Sin embargo, también se ha observado una relación inversa entre la diabetes tipo 2 y el consumo de café cafeinado; de hecho, según Huxley y colaboradores (2009), la ingesta de tres o cuatro tazas al día de café cafeinado y descafeinado disminuye el riesgo de diabetes tipo 2 en un 25 y 33%, respectivamente. Según Naismith y colaboradores (1970) la disminución de la concentración basal de glucosa tras una intervención con café descafeinado se debía a otros componentes de este alimento, distintos a la CF. Sin embargo, es llamativo que en un estudio prospectivo, el consumo regular moderado de café (con CF) disminuyó el riesgo de padecer diabetes gestacional en un 50% con respecto a las mujeres que no consumían café, si bien este efecto no se reprodujo con el café descafeinado (Adeney y cols., 2007).

En lo que respecta al magnesio, este mineral puede haber contribuido a los resultados observados ya que se ha demostrado que puede mejorar la función de las

células β (Paolisso y cols., 1992) y la sensibilidad a la insulina, estando inversamente asociada su ingesta con la diabetes tipo 2 (Salmerón y cols., 1997).

DISCUSIÓN INTEGRADORA

6.1. Biodisponibilidad de Metilxantinas

El elevado consumo de metilxantinas en alimentos comunes y habituales en la dieta como chocolate y todos los derivados de cacao, bebidas con propiedades estimulantes como café, té o sus alternativas como el mate en países sudamericanos, refrescos de cola, etc., así como la presencia de algunas metilxantinas (CF y TP, principalmente) en medicamentos, bebidas energéticas, incluso en goma de mascar, lleva a asumir que la biodisponibilidad de estos compuestos es plenamente conocida. En efecto, existen estudios sobre la farmacocinética y el metabolismo de las principales metilxantinas, pero casi siempre en sus presentaciones farmacológicas (solución oral, cápsulas, comprimidos, etc.). Sorprende, sin embargo, el limitado conocimiento de su biodisponibilidad cuando estos alcaloides son consumidos como integrantes de los alimentos.

De los cuatro estudios existentes sobre la absorción y metabolismo de TB en cacao, sólo uno se realizó tras la ingesta de cacao soluble, determinando la concentración sanguínea y urinaria de TB y CF en un único voluntario (Kumazawa y cols., 1999). Igualmente, en otro estudio se determinaron los niveles de estos dos compuestos en saliva, plasma y orina en 5 voluntarios a los 90 minutos tras la ingesta de chocolatinas, pero sin restricción dietética previa, lo que afectó notablemente las concentraciones detectadas (Ptolemy y cols., 2010). En dos estudios donde sí se aplicó restricción dietética, uno de ellos sólo valoró la presencia en plasma de TB y CF, pero no de sus metabolitos (Mumford y cols., 1996), mientras que en el estudio de Shively y colaboradores (1985) sí se analizaron metabolitos urinarios, pero no en plasma.

Igualmente, la absorción y metabolismo de CF tras la toma de café ha sido escasamente estudiada. Además del estudio con un único voluntario arriba mencionado (Kumazawa y cols., 1999), otro estudio determinó la concentración plasmática media de CF (22,7 μM) y dimetilxantinas durante el consumo de café *ad libitum* por bebedores habituales (ingesta media de CF de 463 mg/d, oscilando entre 180 y 850 mg). En el estudio de Schneider y colaboradores (2003) se determinó la excreción urinaria de metabolitos únicamente entre las 4-5 horas del consumo de una dosis única de café. En trabajos más recientes, nuevamente se reporta sólo la concentración máxima de CF (Teekachunhatean y cols., 2013) o de CF y sus metabolitos mayoritarios (Lang y cols., 2013) en sangre, pero no su eliminación urinaria.

Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de abordar el estudio sistemático de la absorción, metabolismo y excreción de metilxantinas en café y cacao, lo que motivó la realización de dichos estudios en el marco de la presente Tesis. Además, dada la práctica cada vez más habitual de enriquecer alimentos con ingredientes con propiedades funcionales, incluidas metilxantinas, se hace oportuno ampliar el limitado conocimiento al respecto. Dado que uno de los productos solubles de cacao incluidos en esta Tesis estaba suplementado con

metilxantinas (CF, TB y TP), este producto ofrecía una oportunidad única de estudiar la biodisponibilidad de las tres purinas presentes conjuntamente en un alimento.

En la selección y puesta a punto del método para la extracción y análisis cromatográfico de metilxantinas y sus metabolitos se valoraron los procedimientos más comunes que contemplan la extracción en fase sólida (Emara, 2004; Georga y cols., 2001; Kumazawa y cols., 1999; Thevis y cols., 2004; Zydrón y cols., 2004) seguida de separación por HPLC en columna de fase reversa y detección por espectrometría de masas (Schneider y cols., 2001; Thevis y cols., 2004) o por absorción en ultravioleta (Georga y cols., 2001; Zydrón y cols., 2004). Finalmente, se aplicó la extracción en fase sólida (SPE) a las muestras de plasma, mientras que las muestras de orina no necesitaron pretratamiento. El análisis por HPLC-DAD en fase reversa y LC-MS-QTOF permitió la separación y cuantificación de las 7 metilxantinas (CF, TB, TP, PX, 1-MX, 3-MX y 7-MX) y de 5 ácidos metilúricos (1-MU, 1,3-MU, 1,7-MU, 3,7-MU y 1,3,7-MU) con una buena resolución. No obstante, en ninguna de las muestras analizadas se detectaron los ácidos 3-MU y 7-MU, ni los derivados 6-AMMU, producto final de las rutas de biotransformación de TB, ni AAMU y AFMU, derivados de PX. Otros autores sí identificaron estos metabolitos en muestras de orina, si bien siempre tras la ingesta de elevadas dosis de TB (entre 500-700 mg) y CF (superiores a 200 mg) (Rodopoulos y Norman, 1994; Rodopoulos y cols., 1996; Tarka y cols., 1983). Las dosis de TB consumidas por los voluntarios en los estudios abordados en la presente Tesis oscilaron entre 85-177 mg con los dos productos de cacao (Tabla 22 en Material y Métodos), mientras que la CF se ingirió en dosis similares en el estudio del café (70,7 mg) y tras la toma del cacao rico en metilxantinas (75,8 mg).

El análisis de las muestras sanguíneas mostró que la CF resultó ser la metilxantina mayoritaria en plasma tras el consumo de café (Figura 23); sin embargo, la dosis ingerida era muy similar a la del producto CC-MX, lo que explicaba la similitud en los resultados con ambos productos (C_{\max} = 10,5 y 12,1 μ M tras el consumo de café y cacao, respectivamente). La dosis de CF habitualmente encontrada en productos comerciales de cacao y especialmente en café rara vez supera los 100 mg. Así, la ingesta de 96 mg de CF (Teekanchuhatean y cols., 2013) mostraba concentraciones plasmáticas de CF (C_{\max} = 12,7 μ M) similares a las obtenidas con los productos solubles estudiados en esta Tesis Doctoral. Algunos autores han descrito un efecto dosis-dependiente, observando un aumento en la absorción plasmática de CF conforme aumentaba la dosis de esta metilxantina; sin embargo, tras la ingesta de 200 mg de CF pura, su concentración plasmática no superó los valores descritos (Rodopoulos y cols., 1995), lo que confirmaría la posible pérdida de linealidad a dosis elevadas descrita por Kaplan y colaboradores (1997).

De acuerdo con la composición en metilxantinas de los tres productos estudiados (Tabla 22), la baja concentración plasmática de TB observada tras el consumo de café (C_{\max} = 0,12 μ M) se asocia a la baja dosis aportada por este producto y al metabolismo de la CF siguiendo preferentemente la vía de la PX. En el caso de los productos de cacao CC y CC-MX, que

aportaban mayores cantidades de TB, las concentraciones plasmáticas de esta metilxantina fueron superiores (C_{max} = 15,8 y 51,9 μ M, respectivamente, Figura 23). Estos resultados sugieren además una respuesta dosis-dependiente, con una mayor absorción de TB conforme aumenta su ingesta. No obstante, la presencia en plasma de esta metilxantina podría además proceder de la metabolización de la CF presente en los tres productos estudiados, aunque según lo señalado por Atia y colaboradores (2009), sólo un 12% de la CF ingerida se metabolizaría a TB. De forma similar a la CF, la respuesta dosis-dependiente en la absorción de TB podría verse afectada a dosis elevadas. Así, algunos estudios de biodisponibilidad con dosis superiores a 300 mg de TB encontraron concentraciones plasmáticas de esta metilxantina de 40-67,5 μ M en el mismo rango que los aquí observados (Mumford y cols., 1996; Rodopoulos y cols., 1996; Ptolemy y cols., 2010). En nuestro caso, los niveles plasmáticos tanto de TB (Figura 24A) como de CF (Figura 24B) se mantuvieron dentro del rango lineal en relación con la dosis ingerida.

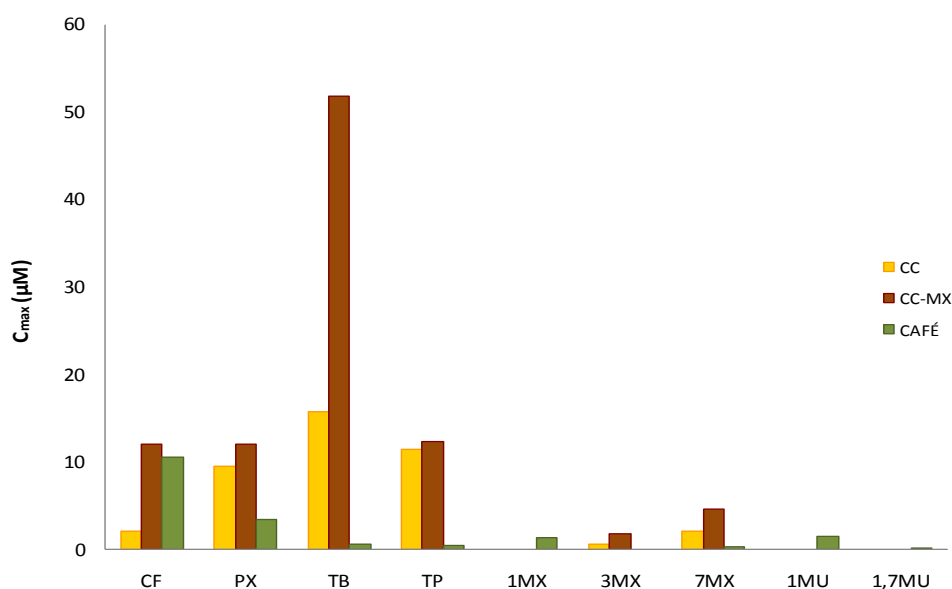


Figura 23. Concentraciones máximas (C_{max} , μ M) de los distintos metabolitos detectados en plasma tras el consumo de cacao (amarillo), cacao rico en metilxantinas (marrón) y café (verde).

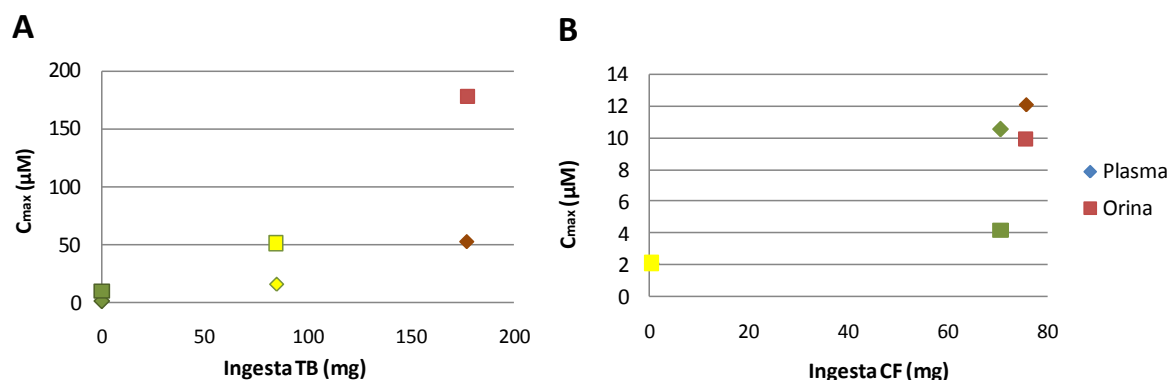


Figura 24. Correlación entre la ingesta total (mg) de TB (A) y CF (B) con la concentración (μM) de estas metilxantinas en plasma (rombo) y orina (cuadrado) tras el consumo de cacao (amarillo), cacao rico en metilxantinas (marrón) y café (verde).

El producto de cacao CC-MX contenía además una dosis minoritaria de TP. Aunque esta metilxantina también se halló en el plasma de los voluntarios tras la ingesta de los otros dos productos en estudio como consecuencia de la N7-desmetilación de CF, la concentración plasmática de TP fue mayor que la de su precursor y fue además similar con los dos cacaos (aproximadamente $C_{max} = 12 \mu M$) aun cuando CC no aportaba TP y sólo 10 mg de CF. La TP (1,3-MX) no es un metabolito derivado de la biotransformación de TB (3,7-MX). Además, dicha concentración plasmática encontrada en ambas intervenciones con cacao fue muy superior a la detectada tras el consumo de café ($C_{max} = 0,39 \mu M$), cuyo metabolismo sí da lugar a la formación de TP aunque minoritariamente (7%; Atia y cols., 2009). Lang y colaboradores (2013) observaron para TP una $C_{max} = 0,67 \mu M$ tras la ingesta de café con 224 mg de CF, en línea con los resultados obtenidos en nuestro estudio con café. Por otra parte, ha de tenerse en cuenta la elevada concentración basal de TP en plasma de los voluntarios antes del consumo de ambos productos de cacao (en torno a $5 \mu M$), aunque no en el caso del café ($0,1 \mu M$), a pesar de similares restricciones dietéticas en ambos estudios. Aunque no puede descartarse que los voluntarios no respetaran las restricciones, el hecho de que ingestas elevadas de CF (70-224 mg) den lugar a C_{max} por debajo de $1 \mu M$ como en el estudios de Lang y colaboradores (2013) y en nuestro estudio con café sugiere que otra debe ser la causa de esas elevadas concentraciones basales de TP.

De forma similar, PX, el principal metabolito derivado de la biotransformación de la CF, se detectó en plasma tras el consumo de los tres productos estudiados (Figura 23). De acuerdo con la conocida metabolización de las metilxantinas, un 80% de la CF absorbida se convertiría en PX (Atia y cols., 2009) y, por tanto, cabría esperar que los dos productos con mayor contenido en CF produjeran una mayor cantidad de PX. Curiosamente, las concentraciones plasmáticas de PX fueron menores tras el consumo de café ($C_{max} = 3,4 \mu M$) que con los cacaos

(C_{\max} = 9,5-12 μ M) y similares a las encontrados por Lang y colaboradores (2013) (C_{\max} = 3,9 μ M). Teniendo en cuenta que el producto CC aportaba menos de 10 mg de CF y el CC-MX 76 mg, frente a los 70 mg del café (Tabla 22) y, además, que la PX no es un metabolito derivado de la TB, nuevamente llama la atención los elevados niveles plasmáticos observados en las intervenciones con cacao. Al igual que con la TP, los niveles basales de PX también fueron elevados en los estudios con cacao (aproximadamente 6 μ M) lo que indudablemente influiría en las concentraciones máximas observadas. Estas altas concentraciones basales de TP y PX se observaron en todos los sujetos participantes en el estudio con los dos productos de cacao, mientras que otras metilxantinas (TB, CF) no se detectaron, lo que descarta el incumplimiento de las restricciones así como problemas analíticos. Además de posibles alteraciones metabólicas en diversas condiciones fisiológicas, un metabolismo endógeno de otras purinas podría justificar estos resultados, ya que otros autores también han observado pequeñas cantidades de algunos metabolitos en plasma y orina de humanos sanos en condiciones basales (Lelo y cols., 1986; Zambonin y cols., 2004).

La presencia en sangre de otros metabolitos derivados de la CF y las metilxantinas TB, TP y PX ha sido poco descrita. La mayor composición en TB de los productos de cacao justificaba la detección de sus metabolitos derivados, 3-MX (C_{\max} = 0,6 μ M con el cacao CC y 1,8 μ M con el cacao CC-MX) y 7-MX (C_{\max} = 2,1 μ M con el cacao CC y 4,6 μ M con el cacao CC-MX); sin embargo, el producto de café tostado/verde aportaba una dosis de TB minoritaria, por lo que únicamente fue detectada la 7-MX y en concentraciones menores a las observadas con los cacaos (C_{\max} = 0,26 μ M). En el estudio de Lang y colaboradores (2013) también detectaron 3-MX, aunque en menor medida que 7-MX, por lo que la dosis de CF parece estar relacionada con la presencia o no de estos metabolitos.

Conocida la elevada metabolización de CF a PX, sería de esperar la presencia en plasma de otros metabolitos derivados de esta ruta. Así, la oxidación de PX tras el consumo del producto de café resultó en la presencia en sangre de ácido 1,7-MU, aunque en concentraciones minoritarias (C_{\max} = 0,06 μ M) (Figura 23). Lang y colaboradores (2013) también observaron pequeñas cantidades de este metabolito en plasma, así como de 3-MX, no observada en nuestro caso. Sin embargo, en este trabajo identificamos por primera vez en plasma 1-MX y el ácido 1-MU, descritos por otros autores como metabolitos mayoritarios en orina. Estos dos metabolitos, que procederían principalmente de la ruta de la PX, aparecían únicamente durante la intervención con café y en menores concentraciones que su precursor (C_{\max} = 1,27 μ M para la 1-MX y 1,44 μ M para el 1-MU). No obstante, ha de resaltarse que ni 1-MX, ni los ácidos 1-MU y 1,7-MU se detectaron en plasma tras el consumo de cacao, a pesar de la similar dosis de CF ingerida en el caso de la intervención con CC-MX, además de la TP aportada por este cacao, precursor también de estos metabolitos.

Las metilxantinas son rápidamente absorbidas, tal y como muestra su detección en plasma desde tan sólo 30 min después de la ingesta de los productos. Las máximas concentraciones de

CF eran alcanzadas en las 2 primeras horas de intervención con los tres productos, siendo en el caso de café la T_{max} = 1,2 h (Figura 25). De forma similar, otros autores detectaron la máxima absorción de CF en plasma en los 60 minutos tras la ingesta de café (Teekachuhatean y cols., 2013) o de CF pura (Perera y cols., 2011).

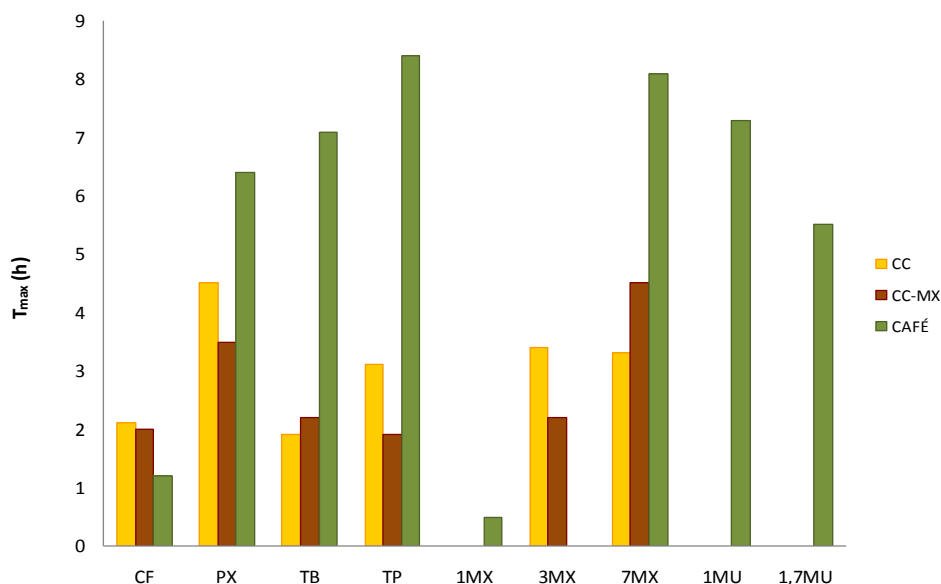


Figura 25. Valores de T_{max} (horas) de los distintos metabolitos identificados en plasma tras el consumo de cacao (amarillo), cacao rico en metilxantinas (marrón) y café (verde).

Las diferentes dosis de TB ingeridas con los productos de cacao y café también se vieron reflejadas en sus constantes farmacocinéticas. Así, la mayor ingesta de TB con los cacaos mostró T_{max} en torno a las 2 h, derivada de la absorción directa de esta dimetilxantina, mientras que la concentración máxima con el café se atrasó a las 7 h, asociada a su transformación metabólica a partir de CF (Figura 25). De forma similar, PX y TP mostraron valores de T_{max} con los cacaos (1,9-4,5 h) menores que con el café (6,4-8,4 h). Los metabolitos derivados de las dimetilxantinas tendían a aparecer más tarde con T_{max} mayores que sus correspondientes precursores (T_{max} = 2,2-8 h para las monometilxantinas y 5,5-7,3 h para los ácidos metilúricos). Sin embargo, tanto 1-MX como 1,7-MU alcanzaron valores de T_{max} menores que los de su principal precursor, la PX. Esto se explicaría por la teoría propuesta por Rodopoulos y colaboradores (1996) y Rodopoulos y Norman (1997), quienes advertían que las metilxantinas podrían ser metabolizadas simultáneamente y no secuencialmente. No obstante, ha de tenerse en cuenta que las dimetilxantinas tienen menor aclaramiento renal que las monometilxantinas y los ácidos metilúricos (Arnaud, 2011; Rodopoulos y cols., 1995); la más rápida eliminación urinaria de éstos justificaría que los picos de concentración plasmática se produjeran antes que los de las dimetilxantinas.

En concordancia con lo anterior, la excreción urinaria de monometilxantinas (mayoritariamente 7-MX y 3-MX en el caso del cacao) y ácido 1-MU (principal metabolito urinario tras el consumo de café) son muy elevadas (Figura 26), dándose las máximas eliminaciones en T_{max} comprendidos entre 6 h (CF) y en torno a 21 h (Figura 27), correspondiendo en general los tiempos más largos a los derivados metilúricos.

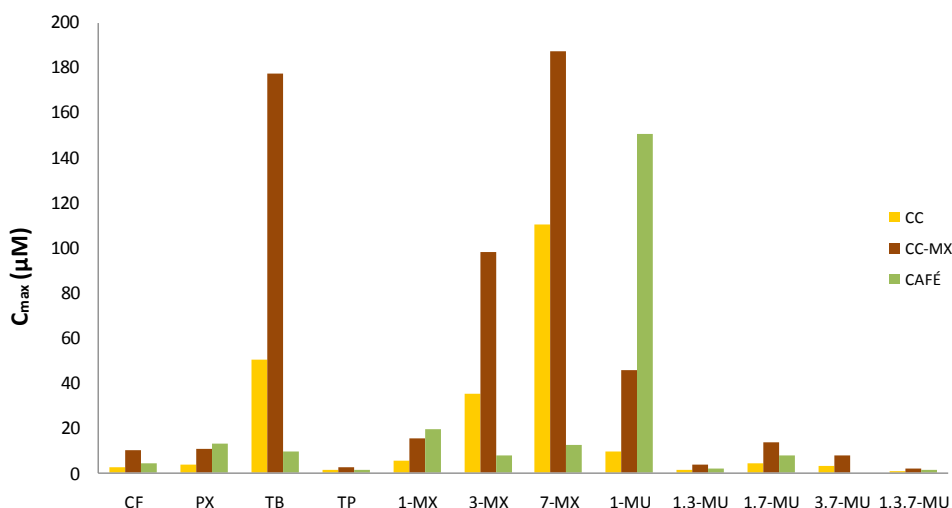


Figura 26. Concentraciones máximas (C_{max} , μM) de los distintos metabolitos urinarios tras el consumo de cacao (amarillo), cacao rico en metilxantinas (marrón) y café (verde).

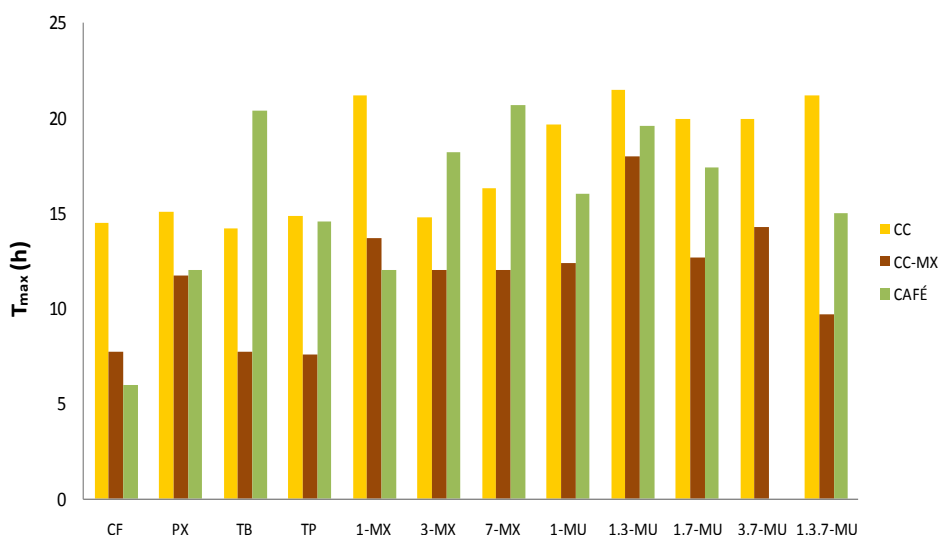


Figura 27. Valores de T_{max} (horas) de los distintos metabolitos identificados en orina tras el consumo de cacao (amarillo), cacao rico en metilxantinas (marrón) y café (verde).

Una vez metabolizadas, las metilxantinas y sus metabolitos derivados pueden detectarse en orina desde las primeras franjas horarias tras la ingesta de cacao y café. Los ácidos metilúricos son los últimos metabolitos en la biotransformación de metilxantinas, por lo que su presencia no sólo es más fácilmente detectable en orina, sino que sus concentraciones superarían las observadas en plasma, justificando también los mayores tiempos necesarios para alcanzar las concentraciones urinarias máximas.

La principal ruta de metabolización de la CF queda patente por la elevada excreción de metabolitos de PX como el ácido 1-MU (67% del total de metabolitos excretados) tras el consumo de café, seguido por otros metabolitos procedentes de esta misma ruta, como son la 1-MX, la 7-MX y la propia PX. Otros autores también apoyan la excreción mayoritaria del 1-MU seguido de 1-MX (44% y 13% del total de metabolitos excretados, respectivamente) como consecuencia del consumo de bebidas conteniendo CF (Bonati y cols., 1982), así como con café, llegando a excretar hasta 400 μM de 1-MU y 166 μM de 1-MX como metabolitos mayoritarios tras la ingesta de hasta 300 mg de CF (Schneider y cols., 2003). La propia CF es excretada rápidamente tras la ingesta de café, representando un 2,7% del total de metabolitos excretados. Estos valores son incluso mayores tras el consumo de CC-MX, aunque el tiempo de eliminación es mayor y la dosis eliminada menor tras el consumo de CC. Cabe mencionar que, al contrario de lo observado en plasma, la concentración de CF en orina no guardó una relación lineal con la dosis ingerida (Figura 24B), ya que ingestas similares de CF con CC-MX y café (75,7 y 70,7 mg, respectivamente) resultaron en concentraciones urinarias menores tras el consumo de café (C_{max} = 4,1 μM con café vs. 9,9 μM con CC-MX).

La mayor proporción de TB ingerida en los cacaos resulta en una mayor excreción de esta metilxantina y de sus metabolitos 3-MX y 7-MX, alcanzando más de un 30% del total tanto para la TB como para la 7-MX con el producto de cacao CC-MX. En este caso contribuirían también la eliminación de TB y sus metabolitos procedentes de la biotransformación de CF, lo que justificaría en parte la mayor excreción de TB observada en CC-MX (C_{max} = 177,4 μM) en comparación con los otros productos que aportaban menores dosis de metilxantinas (C_{max} = 50,4 μM con CC y 9,23 μM con café). La eliminación urinaria de TB mantuvo la relación dosis-respuesta observada en los niveles plasmáticos (Figura 24A), lo que ocurrió también en el caso de 3-MX y 7-MX (datos no mostrados).

Cabe mencionar que, a diferencia de PX, TP y 1-MX, cuyos derivados metilúricos sí se detectan en orina (incluso 1-MU y 1,7-MU en plasma), en ningún caso se detectaron en plasma ni en orina los metabolitos procedentes de la oxidación de estas monometilxantinas, los ácidos 3-MU y 7-MU (ni 3,7-MU tras la toma de café). Esto podría deberse bien a una baja eficiencia de la C8-hidroxilación de estas metilxantinas, o bien a una más lenta metabolización, requiriéndose tiempos de muestreo superiores a las 24 h aquí estudiadas.

Otro aspecto que merece comentarse es el hecho de que ingestas superiores de TB con el producto CC-MX resultaron en valores de T_{\max} de todos los metabolitos urinarios menores que los observados tras el consumo de CC y café (Figura 27). En otras palabras, la mayor excreción de metabolitos se acompañó de una eliminación urinaria más rápida de los mismos.

Dado que el café contenía mínimas cantidades de TB, esto nos permite centrarnos en la absorción, metabolismo y eliminación urinaria de CF en el tiempo. La Figura 28 muestra un esquema de la aparición de los distintos metabolitos en plasma y en orina a lo largo de las 8 y 24 h, respectivamente, de la toma de muestras. Como se ha señalado, la ruta de la PX predomina en el metabolismo de la CF, con rápidas reacciones de N3- y N7-desmetilación que dan lugar a la máxima concentración de 1-MX en plasma a las 0,5 h tras la ingesta de café. Su oxidación por acción de la xantina oxidasa a 1-MU es un proceso más lento, con C_{\max} de este metabolito a las 7 h post-ingesta. Ambos compuestos (1-MX y 1-MU) junto con su precursor PX son los metabolitos mayoritarios tanto en plasma como en orina. Llama la atención que, a pesar de la rápida formación de 1-MX, su eliminación en orina no alcanza el T_{\max} hasta las 12 h. Igualmente, resulta sorprendente que la aparición en plasma de 1,7-MU sea más rápida que la de su precursor, PX (5,5 vs. 6,5 h), aunque la eliminación urinaria sea más rápida en el caso de la PX (12 h vs. 17,4 h para 1,7-MU). Esto va en contra de lo reportado por otros autores en relación con el más rápido aclaramiento renal de ácidos metilúricos que de dimetilxantinas (Arnaud, 2011), aunque sí apoya lo establecido en relación con la concurrencia en paralelo de las distintas vías de metabolización, siendo más lenta en el tiempo la N1 y la N7 desmetilación de CF para rendir TB y TP, respectivamente.

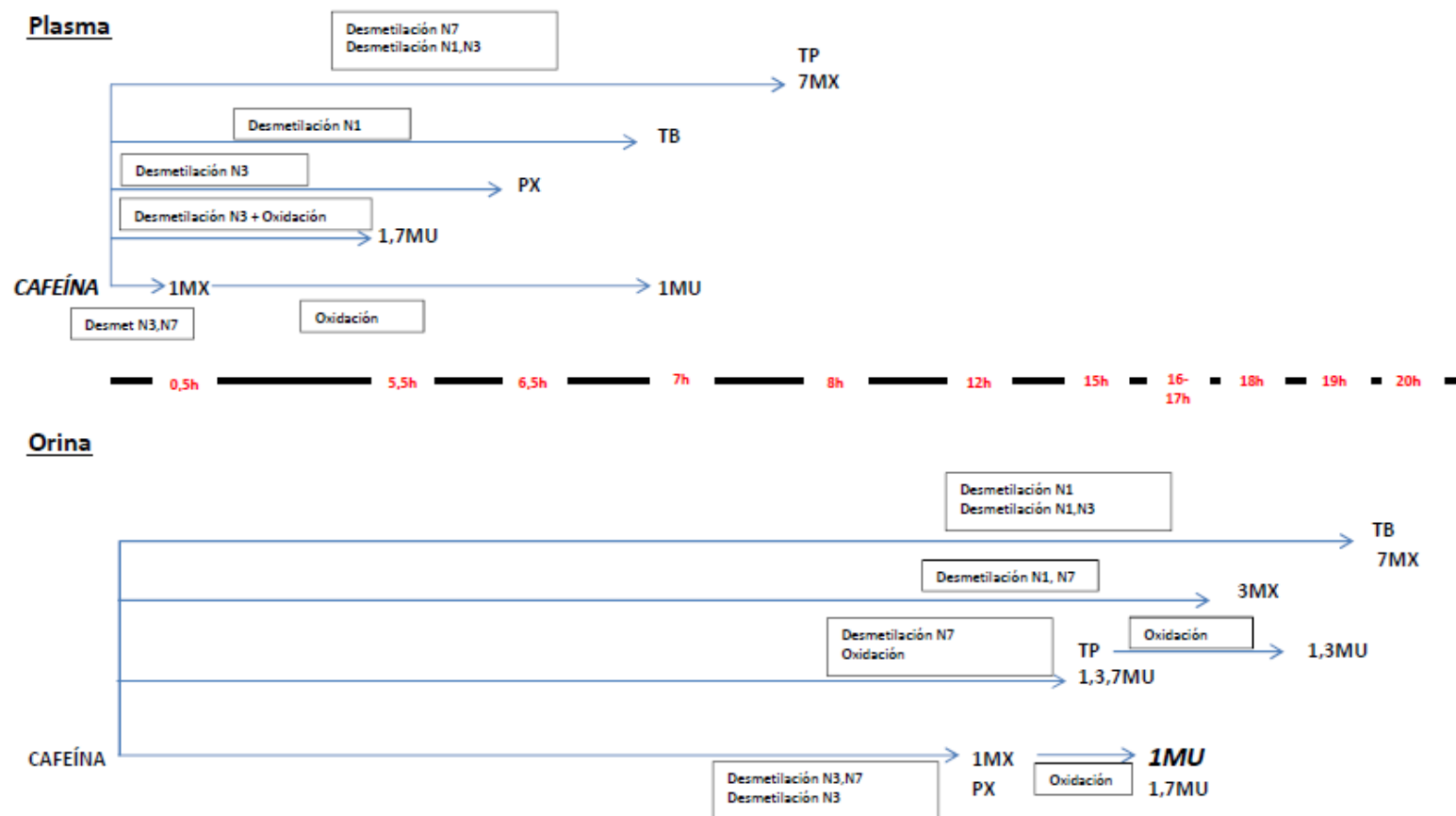


Figura 28. Esquema del metabolismo de CF en plasma y orina tras la ingesta del producto de café mezcla tostado/verde. Los compuestos en cursiva (CF en plasma y 1-MU en orina) corresponden con los metabolitos mayoritarios.

6.2. Salud Cardiovascular

Estudios epidemiológicos apoyan que una dieta rica en flavonoides, tal como la dieta mediterránea, promueve la salud y retrasa la aparición de diversas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares. De hecho, la adherencia a la dieta Mediterránea se asocia con una reducción significativa en la mortalidad cardiovascular (Sofi y cols., 2007). Como se ha comentado anteriormente en esta Tesis, los últimos años están viendo cambios drásticos en los hábitos dietéticos en la población mediterránea, causando un marcado aumento en la mortalidad por ECV (Gómez-Huelgas y cols., 2011). Entre los cambios que han tenido lugar entre 1964 y 2011 en España destaca el aumento del consumo medio de carne, pescado, frutas y productos lácteos a expensas del de verduras, cereales y legumbres (Carbajal, 2013). En contraste, determinados productos de origen vegetal como el cacao y el café siguen siendo alimentos populares no sólo entre los españoles, sino en todo el mundo. Concretamente, los productos solubles de cacao son altamente consumidos en España, formando parte de la dieta de distintos grupos de población, tanto niños y jóvenes como adultos (Cooper y cols., 2008), siendo España el país con mayor consumo mundial de productos solubles de cacao (1,7 kg/persona/año; Urpi-Sarda y cols., 2009). Por otra parte, el café es la segunda bebida más consumida mundialmente, únicamente por detrás del agua. Según datos de la Federación de Café (www.federacioncafe.com), el 63% de los adultos españoles consumen al menos 1 taza de café al día. Teniendo en cuenta este alto consumo, los efectos inducidos por el café pueden tener importantes repercusiones en salud pública.

Numerosos estudios de intervención han valorado los efectos en salud del cacao y del café, si bien en general administrando cantidades muy elevadas. Así, por ejemplo, en el estudio de Khan y colaboradores (2012) los voluntarios consumieron 40 g de un producto de cacao/día o hasta 100 g/d en el estudio de Grassi y colaboradores (2008). Igualmente, en el estudio de Kempf y colaboradores (2010) con café los voluntarios tomaron diariamente 8 tazas de 150 mL o en Yukawa y colaboradores (2004) tomaron 24 g de café al día. Ello hace que los resultados obtenidos en estos estudios que administran a los voluntarios cantidades tan alejadas de lo que se correspondería con un consumo real sean difícilmente extrapolables a una situación normal y lleva a cuestionar la relevancia fisiológica del efecto de los alimentos o de los compuestos bioactivos presentes en los mismos tras este tipo de intervenciones poco realistas.

Es importante resaltar que en la presente Tesis Doctoral se buscó reproducir en la medida de lo posible los patrones de consumo habituales de los alimentos a estudiar dentro del marco del estilo de vida de los voluntarios participantes en las intervenciones nutricionales como representantes de la población actual. No obstante, fue necesario establecer determinadas restricciones para limitar posibles interferencias en la

valoración del impacto específico del café o de los productos solubles del cacao, lo que obligaba a limitar o vetar el consumo de otros derivados del cacao, bebidas estimulantes y ciertos alimentos ricos en polifenoles. Salvo estas restricciones, los voluntarios tomaron dosis que reproducían patrones de consumo reales dentro de los hábitos dietéticos de la población española: 2 raciones de cacao en polvo disueltas en leche dos veces al día, correspondiendo al desayuno y la merienda, y tres tazas de café al día, correspondientes al desayuno, media mañana y café después de la comida o merienda. El aporte de compuestos fenólicos, FD, metilxantinas y/o diterpenos con el consumo diario de CC-FD, CC-PP y el café se muestra en la Tabla 23 del capítulo de Material y Métodos. Estas dosis son menores que en otros estudios como los arriba citados, si bien son aportes normales alejados de sobrecargas no realistas que corresponderían más a la valoración de suplementos dietéticos que a estudios nutricionales con alimentos. Además, cabe destacar que los voluntarios mantuvieron su estilo de vida sin alterar a lo largo de los estudios, incluida su actividad física, que resultó ser sedentaria y reflejar una condición realista característica de la población actual.

El cacao es una importante fuente de flavonoides, principalmente flavanoles como la epicatequina y las procianidinas de bajo peso molecular. Además, contiene otras sustancias biológicamente activas que pueden afectar a la salud como metilxantinas, principalmente TB, y magnesio (Ellam y Williamson, 2013). El cacao es también una fuente importante de FD en contraste con el chocolate (Jenkins y cols., 2000), si bien en su composición predomina la FI (Lecumberri y cols., 2007). Con objeto de potenciar los efectos beneficiosos en salud cardiovascular del cacao, la industria alimentaria ha elaborado productos de cacao enriquecidos en polifenoles, FD y metilxantinas, reduciendo otros componentes que pueden dar lugar a efectos no deseados tales como el aumento de peso, como son los azúcares y grasas.

Igualmente, el café verde es rico en diversas sustancias fitoquímicas que determinan sus efectos saludables. Dentro de los componentes bioactivos del café destacan los compuestos fenólicos, pertenecientes mayoritariamente al grupo de los derivados hidroxicinámicos, con concentraciones que varían entre 6-12% de la materia seca (Chu y cols., 2009). Durante el tostado del grano de café, el contenido de estos compuestos se reduce más del 50%, dependiendo de la temperatura y tiempo aplicado. El café verde es una alternativa más saludable al tradicional café tostado gracias a su mayor contenido en compuestos fenólicos (Mills y cols., 2013), lo que ha llevado a otra importante empresa de la industria alimentaria a elaborar un producto de café mezcla de semillas verdes y tostadas (35:65), más saludable que el café tostado tradicional por su mayor contenido en compuestos fenólicos, pero conservando las apreciadas propiedades organolépticas características de este alimento.

Diversos estudios de intervención sobre los efectos del consumo de cacao o chocolate en la regulación de los niveles de lípidos en sangre han mostrado con frecuencia resultados contradictorios. Estas discrepancias pueden ser atribuidas a diferencias en los grupos de población participantes en los estudios (sujetos sanos o con alto riesgo cardiovascular), la cantidad de flavonoides administrada, la formulación de los productos de cacao o la duración del estudio (Arranz y cols., 2013). En este sentido, un meta-análisis reciente centrado en los efectos de productos de cacao/chocolate negro en lípidos séricos concluyó que las intervenciones con una duración entre 2 y 12 semanas con estos productos redujeron significativamente los niveles de LDL-C y CT, si bien no se observaron efectos estadísticamente significativos en HDL-C y TG (Tokede y cols., 2011). Otro meta-análisis también apoyó que el consumo de cacao rico en flavonoides mejora significativamente los niveles de lípidos circulantes sin afectar los TG (Shrime y cols., 2011). De manera similar, diversos estudios epidemiológicos han abordado la asociación entre el consumo de café y los lípidos séricos. Hasta la fecha, los estudios de intervención con café son más escasos y emplean distintas cantidades de café, cafés con diferentes composiciones y dispares protocolos en la preparación de la infusión. En un reciente meta-análisis de 12 estudios de intervención aleatorizados y controlados se concluye que la ingesta de café, especialmente si es no filtrado, contribuye significativamente al incremento de CT, LDL-C y TG (Cai y cols., 2012). Los autores puntualizan que los efectos del café son más acusados en ensayos con una duración menor a 8 semanas, mientras que en estudios de más larga duración se observa una tendencia a que el CT se vea modificado sin encontrar una asociación entre la duración de la intervención y cambios en LDL-C o TG después de hacer un ajuste por números de tazas consumidas o tipo de café (Cai y cols., 2012).

En la presente Tesis Doctoral, el resultado más significativo observado después de consumir CC-FD o CC-PP fue el aumento de HDL-C en concordancia con los datos revisados por Arranz y colaboradores (2013) y Shrime y colaboradores (2011), si bien en nuestro caso no se observó la disminución en los niveles de LDL-C reportada por otros autores. Sería interesante saber en qué medida el efecto en HDL-C de los dos productos de cacao es debido al contenido de flavanoles (Baba y cols., 2007a; Baba y cols., 2007b; Khan y cols., 2012; Hooper y cols., 2008), fibra dietética (Wu y cols., 2003; Tillotson y cols., 1997) o metilxantinas (Neufingerl y cols., 2013), puesto que las tres familias de compuestos bioactivos han mostrado tener la propiedad de incrementar las concentraciones de HDL-C. Hasta la fecha, numerosas evidencias científicas apuntan a los polifenoles como principales responsables de los beneficiosos efectos cardiovasculares del cacao (Arranz y cols., 2013; Ellam y Williamson, 2013). Valorando el aporte diario de polifenoles por los dos cacaos solubles, ambos productos proporcionaron cantidades similares de flavanoles (Tabla 23) teniendo en cuenta que, aunque la concentración de flavonoides en CC-PP era el doble que en CC-FD, la cantidad de cacao consumida diariamente fue la mitad en la intervención con CC-PP. En

consecuencia, el consumo diario de flavanoles fue de 45,3 y 43,8 mg con CC-PP y CC-FD, respectivamente, por lo que la contribución de compuestos fenólicos a los efectos cardiovasculares observados en ambos estudios sería similar. Cabe señalar que CC-FD contenía una cantidad menor de epicatequina que CC-PP (9,30 vs. 18,90 mg/g, respectivamente); por el contrario, el contenido de catequina fue mayor en CC-FD que en CC-PP (18,00 vs. 7,05 mg/g, respectivamente). Probablemente el proceso implicado en la fabricación de los productos es responsable de esta diferencia, ya que el tostado es un paso crucial en el procesamiento del cacao que conduce a pérdidas y modificaciones de la composición de flavanoles, especialmente la epimerización de (-)-epicatequina a (-)-catequina (Kothe y cols., 2013). Desde el punto de vista cardiovascular, nuestros resultados apuntan a que los isómeros catequina y epicatequina tienen una actividad biológica similar.

Por otra parte, cabe sugerir que la FD (especialmente la fracción insoluble) y la TB en CC-FD no contribuyeron de manera relevante al incremento observado en los niveles de HDL-C, ya que su mayor contenido en CC-FD respecto a CC-PP no resultó en distintos niveles de HDL-C tras el consumo de ambos cacaos. De manera similar, la falta de efecto del café sobre los niveles de HDL-C confirmaría que ni las metilxantinas ni la FD [con un aporte cercano al proporcionado por el CC-PP (4,1 g/d, Tabla 23), si bien ésta sería fundamentalmente FS] tienen un papel relevante sobre los niveles de esta lipoproteína, al igual que los ácidos hidroxicinámicos del café. Esto permitiría circunscribir dicho papel a los flavonoides, pudiendo éstos haber producido el aumento de HDL-C a través de distintos mecanismos, como el incremento de la expresión de SR-BI, SREBPs, ABCA1 o la apolipoproteína A1, entre otros (Khan y cols., 2011; Yasuda y cols., 2011).

Teniendo en cuenta que el café mostró un efecto hipolipémico sólo en los sujetos hipercolesterolémicos, reduciendo la concentración de CT, LDL-C, VLDL-C y TG sin modificar los niveles de HDL-C, llama la atención que los efectos de los cacaos y del café sobre el perfil lipídico fueran tan distintos (Figura 29). Estas diferencias podrían asociarse al distinto aporte total de compuestos polifenólicos con ambos productos (472,5 y 510,6 mg/d con CC-FD y CC-PP, respectivamente, frente a 1261,1 mg/d con el café, Tabla 23) y, en especial, a la distinta composición de los mismos (flavanoles principalmente en los productos de cacao, frente a los derivados hidroxicinámicos aportados por el café). Así mismo, el contenido y la naturaleza de las metilxantinas (TB mayoritariamente en los productos de cacao y CF en el café) también fueron diferentes en ambos alimentos, al igual que la FD de estas bebidas (fundamentalmente FI en los productos de cacao y exclusivamente FS en café), teniendo en cuenta además la presencia de diterpenos en el café (Tabla 23).

Los mecanismos de regulación del CT, LDL-C y TG en humanos por componentes del café han sido poco estudiados. En modelos animales se ha observado que los ácidos

clorogénico y cafeico inhiben la absorción y transformación de lípidos en el hígado, así como la síntesis hepática de colesterol al suprimir la actividad de los enzimas ácido graso sintasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa y acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT) (Cho y cols., 2010). Por otra parte, la ingesta de CF está inversamente relacionada con el perfil lipídico (Cai y cols., 2012). En el presente estudio el café aportó 212,1 mg/d de CF, lo que podría resultar en un efecto hiperlipemiente tras el consumo de esta bebida; sin embargo, también aportaba diariamente 496 mg de ácidos hidroxycinámicos, de los cuales 151 mg eran ácido clorogénico, que pueden haber contrarrestado el efecto negativo de la CF. En este sentido, nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos de otros autores, quienes describieron que tras la ingesta de un extracto de café que aportaba 100 mg diarios de ácido clorogénico se reducían los niveles de LDL-C en sujetos moderadamente hipertensos al borde de la hipercolesterolemia (Kozuma y cols., 2005).

Es notable que ninguno de los productos modificó los niveles de TG (Figura 29), salvo el café en el grupo hipercolesterolémico, con un 20% menos de TG con respecto a la situación basal. Este resultado es similar a la reducción de TG (27% menos con respecto a la situación basal) observada por otros autores en sujetos sanos tras la ingesta de 8 g de café soluble tostado de la variedad Arábica tres veces al día durante 1 semana (Yukawa y cols., 2004), si bien en nuestro caso los voluntarios sanos no vieron alterados sus niveles de TG (Figura 29). La fibra aportada por el café podría haber jugado un papel en la disminución de estos lípidos séricos, ya que se ha descrito que los cereales integrales pueden reducir los niveles de TG postprandiales a través la síntesis de lipoproteínas ricas en TG y/o de su catabolismo mediado por un incremento de la actividad de la lipoproteína lipasa (Giacco y cols., 2014). No obstante, esto no justificaría la falta de efecto observada con el café en los voluntarios sanos, aunque éstos tenían menores niveles de TG en comparación con los voluntarios hipercolesterolémicos, como tampoco justificaría la falta de efecto con los productos solubles de cacao, que aportaron cantidades similares o superiores de fibra (Tabla 23), en especial con CC-FD, si bien ambos productos solubles de cacao aportaban fundamentalmente FI frente a la FS del café.

El contenido en diterpenos del café varía sustancialmente según el tipo de café y la forma de preparación de la infusión. El producto soluble de café mezcla tostado/verde empleado en la presente Tesis era de la variedad Arábica. Según Silva y colaboradores (2012), los valores de diterpenos en café soluble Arábica tostado (2 g en 150 mL) son de 0,01-0,06 y 0,04-0,2 mg de kahweol y cafestol, respectivamente, cantidades relativamente bajas en comparación con otras variedades de café, por lo que es probable que el efecto hiperlipémico de este compuesto haya sido mínimo.

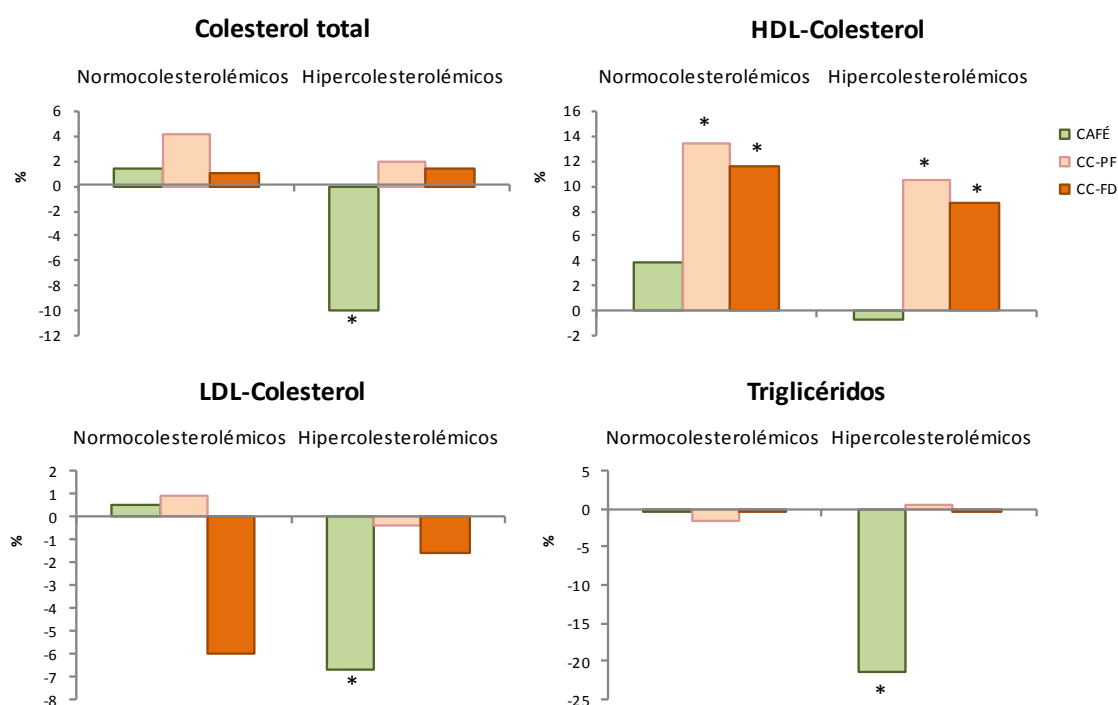


Figura 29. Variaciones (%) de los distintos biomarcadores lipídicos determinados tras el consumo regular de cacao enriquecido en polifenoles (CC-PP, rosa), cacao enriquecido en fibra dietética (CC-FD, naranja) y el producto de café (verde). Las barras representan el porcentaje de variación observado tras el consumo de cada producto con respecto a su respectiva situación basal. Los asteriscos indican diferencias significativas debidas a la ingesta de cada producto dentro de su correspondiente estudio según el test de medidas repetidas.

Los efectos positivos del cacao sobre la tensión arterial han sido principalmente atribuidos a su contenido en flavanoles, ya que éstos pueden modular los niveles y bioactividad del sistema del óxido nítrico y favorecer así una adecuada vasodilatación (Fisher y cols., 2003; Duarte y cols., 2014). En una revisión reciente, Hooper y colaboradores (2012) concluían que la epicatequina era el principal responsable del efecto hipotensivo del cacao, mostrando dicho efecto a partir de ingestas diarias de más de 50 mg. Esto justificaría por qué la dosis diaria de epicatequina proporcionada por los productos de cacao CC-PP (18,9 mg/d) y CC-FD (9,3 mg/d) no produjo cambios sobre la PA. Sin embargo, en individuos hipertensos sí se observaron efectos positivos sobre la tensión con cantidades mucho más bajas de epicatequina (5,1 mg) después de 18 semanas (Taubert y cols., 2007).

Por otra parte, el elevado aporte de derivados hidroxicinámicos en el estudio con café dio lugar a una clara disminución de la PA y la FC, en consonancia con los resultados de Yamaguchi y colaboradores (2008) en individuos normo e hipertensos tras la ingesta 300 mg/día de derivados hidroxicinámicos durante 4 semanas, y con los de Vinson y colaboradores (2012), que observaron una reducción en la FC de individuos obesos pre-hipertensos tras la ingesta durante 6 semanas de un extracto de café verde que aportaba 1 g/día de derivados hidroxicinámicos. Parece que en nuestro estudio el alto contenido en derivados hidroxicinámicos contrarrestó los posibles efectos negativos de la CF, que fue 15 veces mayor en el café (212,1 mg/d) con respecto a los productos de cacao ensayados (15,3 mg/d con CC-FD y 13,2 mg/d con CC-PP) y también los posibles efectos adversos de las hidroxihidroquinonas formadas durante el tostado del grano de café (Zhao y cols., 2011). Además de los derivados hidroxicinámicos, la FD presente en el café (4,1 g/d) ha podido contribuir a un efecto hipotensivo de acuerdo con estudios previos en individuos pre-hipertensos que consumieron un producto soluble de cacao que aportaba 12 g/d de FD y 283 mg/d de polifenoles durante 8 semanas (Sarriá y cols., 2012).

La fibra dietética en CC-FD también puede ser responsable de la disminución de los niveles de glucosa observados después de consumir el cacao rico en fibra, pero no con el cacao rico en polifenoles. Este efecto se puede relacionar con la capacidad que presentan los alimentos ricos en fibra de retrasar la absorción de glucosa en el intestino delgado (Giacco y cols., 2000) y mejorar la sensibilidad a la insulina (Tokede y cols., 2011). Adicionalmente, es factible que la TB en CC-FD haya desempeñado un papel en la disminución de la glucosa en ayunas de acuerdo con Kelly (2005), ya que las metilxantinas inhiben la fosfodiesterasa y de tal modo aumentan la concentración intracelular AMPc en las células pancreáticas, antagonizando los receptores de purina P1 (Bruinsma y Taren, 2000). En cambio, las metilxantinas están negativamente acopladas a la adenilato ciclasa en los hepatocitos e inducen una disminución en la concentración de AMPc en estas células (Doyle y Egan, 2003). Debido a que la secreción de insulina por las células β pancreáticas y la salida de glucosa del hígado dependen directamente de la concentración intracelular de AMPc, es razonable especular que las metilxantinas pueden influir positivamente en el metabolismo de la glucosa en el ser humano (Grassi y cols., 2005b). En contraste, a la CF se ha atribuido la capacidad de empeorar la tolerancia a la glucosa y disminuir la sensibilidad a la insulina (Dekker y cols., 2007; Beaudoin y Graham, 2011). Sin embargo, cuando la CF forma parte del café, los efectos son distintos, habiéndose descrito una relación inversa entre el café y la diabetes mellitus tipo 2 (revisado en Akash y cols., 2014). Según Huxley y colaboradores (2009), la ingesta de tres o cuatro tazas al día de café cafeinado y descafeinado disminuye el riesgo de diabetes tipo 2 en un 25 y 33%, respectivamente. Este conocido efecto protector del café sobre la diabetes tipo 2 (Ärnlöv y cols., 2004; van Dam y cols., 2004; Loopstra-Masters y cols., 2011) queda patente en este estudio. Es notable que con la ingesta de

tres tazas de café al día, que representa condiciones realistas en nuestro país y se puede considerar como un consumo moderado a nivel mundial, el café mezcla tostado/verde haya dado lugar una disminución de la glicemia en ayunas, así como al incremento de la sensibilidad a la insulina.

Los efectos beneficiosos del café sobre el metabolismo de la glucosa se deben atribuir a otros componentes distintos a la CF, principalmente a su alto contenido en compuestos fenólicos antioxidantes (Cano-Marquina y cols., 2013), no sólo por su capacidad de disminuir el estrés oxidativo y proteger a la célula β pancreática del daño oxidativo, factores que predisponen a desarrollar la resistencia a la insulina (Henriksen y cols., 2011), si no que también pueden mejorar el metabolismo de la glucosa actuando sobre la gluconeogénesis y glucogenolisis hepática, sobre la secreción de incretinas (hormonas digestivas GLP-1 y GIP) o sobre la microflora intestinal (Tunnicliffe y cols., 2008). En la discusión del capítulo del café se plantean los mecanismos sugeridos por diversos autores (Arlon y cols., 1997; Higdon y Frei, 2006; van Dam y cols., 2006; Oliveira y cols., 2008; Narita y cols., 2009) a través de los cuales los ácidos hidroxycinámicos del producto de café mezcla tostado/verde podrían haber actuado disminuyendo la concentración de glucosa en ayunas en los dos grupos de estudio y reduciendo los niveles de insulina en el grupo normocolesterolémico (no llegando a ser estadísticamente distintos) sin producir cambios en el grupo de riesgo. Estos efectos positivos se pueden atribuir a su alto contenido en ácidos hidroxycinámicos, aportados principalmente por el 35% de café verde, mientras que el 65% de café tostado aportaría una menor cantidad de compuestos bioactivos. Sin embargo, esta parte mayoritaria jugó un papel muy importante ya que, frente al amargor del café verde, el café tostado hizo que la bebida conservara el aroma y sabor característicos del café que hacen que sea una bebida tan apreciada, asegurando así su consumo regular.

Los efectos sobre la glucosa e insulina en ayunas se relacionan con un incremento significativo en la sensibilidad a la insulina, estimada a través del índice QUICKI, que concuerda con la disminución significativa de la resistencia a la insulina, determinada mediante el índice HOMA-IR, en ambos grupos. Igualmente, se produjo un aumento notable (aunque no estadísticamente significativo, Tabla 38) en la funcionalidad de las células β pancreáticas, estimado a través del índice HOMA- β . Estos parámetros no pudieron ser calculados en los estudios con los productos de cacao, dado que no se determinaron los niveles de insulina en ayunas. No obstante, diversos estudios con cacao reconocen su papel beneficioso mejorando la tolerancia a la glucosa y disminuyendo la resistencia a la insulina (descenso de valores HOMA-IR), tal como se recoge en diversas revisiones y meta-análisis (Shrime y cols., 2011; Hooper y cols., 2012; Arranz y cols., 2013; van Dam y cols., 2013), habiéndose sugerido diversos mecanismos de acción de los flavonoides inhibiendo la digestión de carbohidratos y la absorción intestinal de glucosa, el incremento en la expresión de receptores de insulina y en la

secreción de esta hormona por las células pancreáticas, modulando el metabolismo hepático de la glucosa y aumentando la expresión de transportadores de glucosa y, por tanto, su captación en tejidos diana.

Otro componente bioactivo del cacao y del café que puede haber contribuido a los resultados observados sobre la glicemia y, en el caso del café, sobre la insulinemia y los marcadores de riesgo, es el magnesio. Este micronutriente ha mostrado tener capacidad para mejorar la función de las células β (Paolisso y cols., 1992) y la sensibilidad a la insulina. Teniendo en cuenta que el café y el cacao tienen efectos protectores sobre la diabetes tipo 2 que son dosis-dependientes (Shrime y cols., 2011), se puede esperar que los efectos beneficiosos que se han observado tras el consumo moderado de café mezcla tostado/verde podrían incrementarse con un consumo mayor a tres tazas de café al día, lo cual podría ser recomendable en personas que se encuentran en fases tempranas de la diabetes tipo 2 dado que, adicionalmente, presenta efectos positivos sobre la tensión arterial, lipemia o composición corporal, entre otros.

A pesar del alto poder antioxidante observado en extractos de una bebida de cacao, frente al té o el vino (Lee y cols., 2003) y su efecto retrasando la oxidación de las LDL plasmáticas (Vinson y cols., 2006), los sujetos que consumieron los productos de cacao CC-FD y CC-PP no mostraron una mayor capacidad antioxidante en suero después de las 4 semanas de intervención. Este resultado puede atribuirse a que ambos productos aportaban dosis de flavanoles relativamente pequeñas en comparación con otros componentes antioxidantes presentes en la sangre como el ácido úrico o vitaminas antioxidantes como el ácido ascórbico o el tocoferol (Fraga y cols., 2014) y a que los flavanoles presentan una baja biodisponibilidad, alcanzando su máxima concentración en plasma 2 horas después de la ingesta (Steinberg y cols., 2002). Teniendo en cuenta además que la capacidad antioxidante se midió en muestras de sangre extraídas de los voluntarios tras un ayuno de 12 horas y tras más de 16 horas después de la toma de la última ración de cacao, no es sorprendente su falta de efecto sobre este parámetro. En cambio, los derivados hidroxicinámicos del café presentan mejor biodisponibilidad que los flavonoides del cacao (Stalmach y cols., 2014). Además, su metabolización da lugar a una elevación en la concentración de metabolitos a las 2 y 10 horas tras la ingesta (Renouf y cols., 2014). Dado que los voluntarios tomaron 3 dosis de café al día, repartidas ente el desayuno, media mañana y la merienda, se puede considerar que durante la intervención con café los voluntarios presentaron una concentración elevada, prácticamente sostenida, de metabolitos procedentes de los derivados hidroxicinámicos, siendo también superior la dosis de compuestos fenólicos aportada por el café en comparación con el cacao (Tabla 23). La diferencia entre la metabolización de los flavanoles y los derivados hidroxicinámicos, junto a la aportación 2,5 veces mayor de polifenoles a partir del café en comparación con el cacao, pueden explicar por qué el consumo regular de café mezcla tostado/verde dio lugar a un incremento significativo

en la capacidad antioxidante del suero de los voluntarios a diferencia del cacao (Figura 30).

Por otra parte, se ha descrito que cuando el cacao se mezcla con leche disminuye la biodisponibilidad de los polifenoles (Serafini y cols., 2003), aunque nuevamente existen evidencias contradictorias (Keogh y cols., 2007; Urpi-Sarda y cols., 2010). Por ello, no puede descartarse la contribución de la leche afectando la biodisponibilidad de los flavonoides del cacao (dado que ambos productos de cacao se disolvieron en leche) frente al café, preparado en agua. Adicionalmente, las metilxantinas del café también pueden haber contribuido al incremento en la capacidad antioxidante del suero observado (Azam y cols., 2003). Como consecuencia del incremento de la capacidad antioxidante, el daño oxidativo de los lípidos séricos de los voluntarios, cuantificado a través de la concentración de MDA, así como el daño a proteínas medido a través del análisis de GC, disminuyó significativamente tanto en los voluntarios sanos como en los hipercolesterolémicos (Figura 30), no así tras el consumo de los productos solubles de cacao.

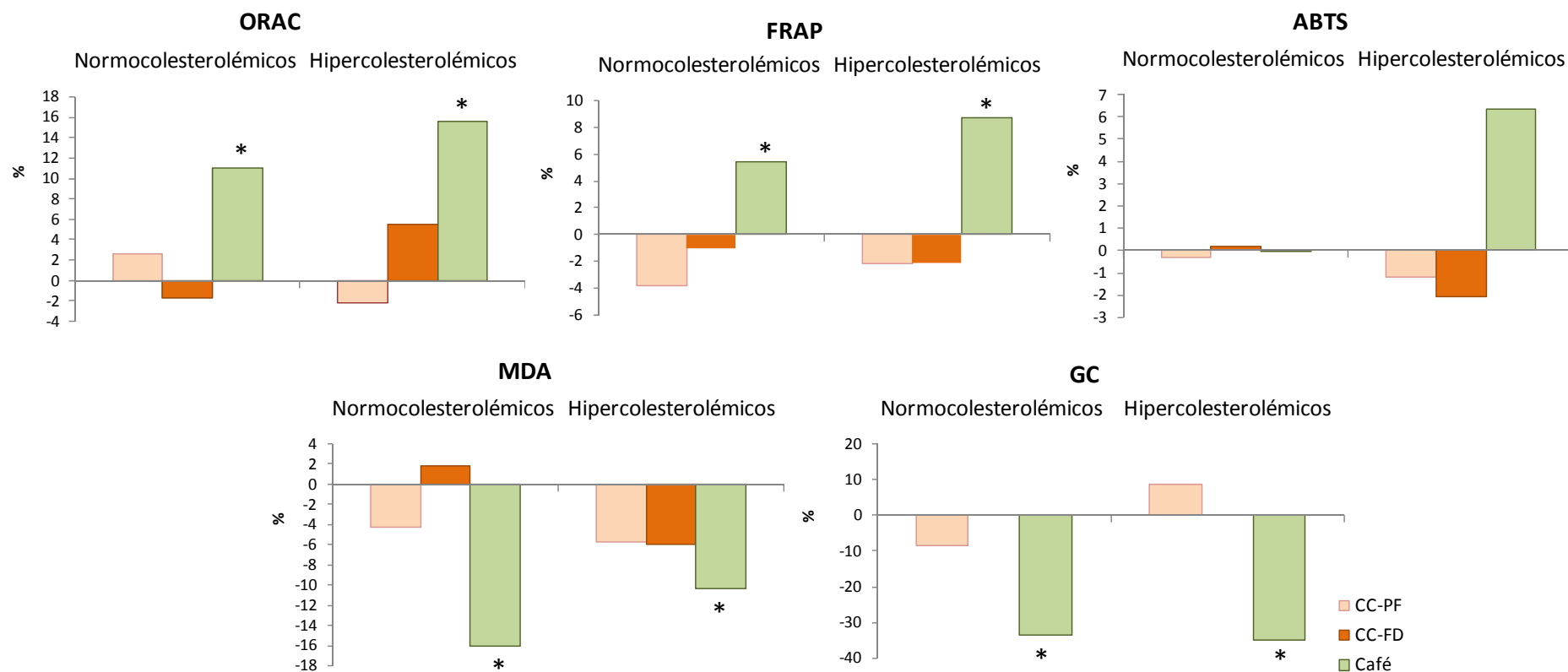


Figura 30. Variaciones en la capacidad antioxidante (ORAC, FRAP, ABTS) y el daño oxidativo a lípidos (MDA) y proteínas (GC) tras el consumo regular de cacao enriquecido en polifenoles (CC-PP, rosa), cacao enriquecido en fibra dietética (CC-FD, naranja) y el producto de café (verde). Las barras representan el porcentaje de variación observada tras el consumo de cada producto con respecto a su respectiva situación basal. Los asteriscos indican diferencias significativas debidas a la ingesta de cada producto dentro de su correspondiente estudio según el test de medidas repetidas.

La inflamación y la disfunción endotelial contribuyen al desarrollo de aterosclerosis y al mayor riesgo cardiovascular. A este respecto, los dos alimentos estudiados mostraron cierto efecto anti-inflamatorio, inducido por la disminución de los niveles de IL-1 β después del consumo regular de CC-FD, en contraste con CC-PP donde la disminución no llegó a ser significativa, así como en el descenso de la PCR en el estudio con café y la disminución (aunque no estadísticamente significativa) de las citoquinas pro-inflamatorias de activación general IL-1 β , IL-6 y TNF- α y de sVCAM-1 en los voluntarios normocolesterolémicos tras el consumo de café. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores que describieron una relación inversa entre el consumo de café cafeinado filtrado y los marcadores de inflamación, incluyendo la PCR (Williams y cols., 2008). Sin embargo, en una población de mujeres también se observó una relación inversa entre el café descafeinado y los niveles de PCR en las voluntarias sanas (López-García y cols., 2006), lo que sugiere que la CF no es responsable del efecto anti-inflamatorio en contra de las observaciones de Li y colaboradores (2011). Por tanto, cabe pensar en los polifenoles, la FD y las melanoidinas del café como los componentes bioactivos responsables de la respuesta anti-inflamatoria. Estudios anteriores asocian una dieta rica en fibra con niveles más bajos de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF-R2 (Ma y cols., 2008) y la alta ingesta de productos integrales con niveles más bajos de PCR y TNF- α (de Lutseyet, 2007; Jensen y cols., 2006; Katcher y cols., 2008; Yamashita y cols., 2012). Estos efectos anti-inflamatorios de los productos integrales se han atribuido a los efectos sinérgicos de la FD, minerales, polifenoles y a otros fitoquímicos asociados a la fibra. En consonancia, estudios epidemiológicos demuestran que la fibra de cereales, fuente de FI principalmente, ofrece protección frente a ECV y diabetes (Du y cols., 2010). Por otro lado, el café es una rica fuente de antioxidantes, como el ácido clorogénico, melanoidinas y varios compuestos liposolubles como los furanos, pirroles y maltol, así como potasio, niacina y magnesio (Wu y cols., 2009). Estos componentes del café también pueden contribuir a la respuesta anti-inflamatoria. Las melanoidinas y los derivados hidroxycinámicos han mostrado tener un leve efecto anti-inflamatorio tras el consumo de café (Vitaglione y cols., 2010). Los derivados hidroxycinámicos y los diterpenos del café podrían estar implicados en la menor expresión de las moléculas de adhesión sICAM-1 (Kim y cols., 2006; Chang y cols., 2010).

En los estudios realizados con cacao y café se controlaron tres importantes factores que podrían afectar los resultados, como son la dieta, la actividad física y los cambios de peso corporal. A todos los voluntarios se les indicó que mantuvieran su estilo de vida habitual, lo que hicieron atendiendo a los resultados de los registros dietéticos de 72 horas y a los cuestionarios de actividad física. En lo que respecta a la dieta, en los estudios con cacao solo se observó un incremento en la ingesta de FD y proteína, atribuidos al consumo del producto cacao y a la leche en la que se disolvía, respectivamente, mientras que en el estudio con café se produjo una disminución en la ingesta proteica. Es de destacar que la ingesta de FD con el consumo de CC-FD la ingesta

de FD durante el estudio se acercó a los valores de ingesta recomendada para las mujeres, aunque aún no se alcanzaba la cantidad recomendada para hombres (Figura 31). No se puede descartar que de no haber aplicado restricciones alimentarias durante los estudios (muchos de los alimentos restringidos eran de origen vegetal), se habría alcanzado la ingesta de fibra recomendada. Además, se ha de tener en cuenta que las bases de datos de composición de alimentos tienden a subestimar los valores de FD contenidos en los alimentos (Saura-Calixto y Goñi, 2004). En relación a la actividad física, ésta no fue diferente a lo largo de ninguno de los estudios, lo que hace uniforme la posible influencia de este factor.

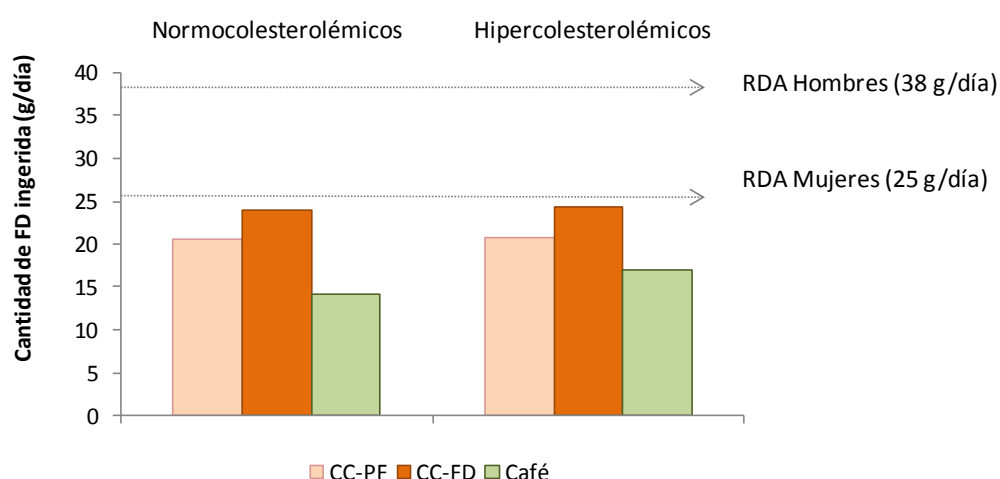


Figura 31. Cantidad de fibra dietética total ingerida durante las intervenciones con los productos de cacao y el producto de café.

A lo largo de los estudios con cacao no cambió ninguno de los parámetros antropométricos, tan sólo se observó una disminución significativa en el pliegue cutáneo subescapular en ambos grupos que no fue apoyada por los datos de la biometría. Por lo tanto, los resultados de estos estudios coinciden con los de Buijsse y colaboradores (2006) quienes describieron que la ingesta energética de los consumidores de chocolate negro era mayor que la de los no consumidores, pero que el IMC era menor en el primer grupo. Este efecto anti-obesidad del cacao ha sido atribuido a su contenido en polifenoles por su efecto modulando el metabolismo lipídico, disminuyendo la síntesis de ácidos grasos y sistemas de transporte y aumentando la termogénesis en el hígado y el tejido adiposo, según experimentos en ratas (Matsui y cols., 2005).

Sin embargo, la ingesta regular del producto de café mezcla tostado/verde redujo el peso y la grasa corporal en los dos grupos de voluntarios y disminuyó, aunque no estadísticamente, la circunferencia de la cintura en los sujetos hipercolesterolémicos. Otros estudios han descrito el efecto anti-obesidad de extractos de café verde (Onakpoya y cols., 2010; Vinson y cols., 2012) y del café descafeinado (Greenberg y cols., 2005), estudios en los que se apunta a los polifenoles del café como los compuestos responsables de estos efectos. En este sentido, aunque los mecanismos de acción de los derivados hidroxicinámicos del café, y más concretamente del ácido clorogénico, aún no son bien conocidos, estudios en animales de experimentación sugieren que producen una menor lipogénesis como consecuencia de la menor actividad de las SREBPs (Murase y cols., 2011), además de por un efecto inhibitorio de la absorción de glucosa (Thom, 2007). El efecto anti-obesidad del café también puede atribuirse a la CF, dada su capacidad de aumentar la termogénesis, lipólisis y β -oxidación de grasas (Greenberg y cols., 2006).

Además en el estudio con café se profundizó en los efectos de este alimento sobre la secreción de hormonas gástricas y adipoquinas, observándose un descenso significativo de los niveles de grelina, leptina, resistina y PAI-1 en ambos grupos de población, así como de visfatina en los sujetos normocolesterolémicos, en consonancia con los menores niveles plasmáticos de grelina descritos recientemente en otros estudios (Bakuradze y cols., 2014). Hasta la fecha no están claros los mecanismos por los que los componentes del café regulan la secreción de este tipo de hormonas. Considerando que el consumo de un producto de café descafeinado no altera los niveles de grelina (Greenberg y Geliebter, 2012), cabría pensar en el papel de la CF. Sin embargo, este efecto no se observa cuando se ingiere únicamente la misma cantidad de CF (240 mg) (Gavrieli y cols., 2011), similar a la aportada por el producto de café mezcla tostado/verde, lo que apunta a la implicación de los polifenoles. Según otros estudios, tanto la CF (Pham y cols., 2014; Westerterp-Plantenga y cols., 2005) como los derivados hidroxicinámicos (Cho y cols., 2010) están implicados en una menor secreción de leptina y PAI-1, pudiendo también haber influido estos dos componentes del café en la disminución de los niveles de resistina.

Atendiendo a los resultados de los estudios con cacao, el consumo regular moderado de este alimento podría ser recomendado a la población en general para mejorar su salud cardiovascular en el contexto de una dieta equilibrada. Igualmente, la mezcla de café verde y tostado podría ser recomendada a la población adulta en general, pero es especialmente indicado para personas moderadamente hipercolesterolémicas o hipertrigliceridémicas, así como para individuos con riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2, siempre dentro de una dieta equilibrada, como medida dietética para mejorar su salud.

CONCLUSIONES

BIODISPONIBILIDAD DE METILXANTINAS EN PRODUCTOS DE CACAO Y CAFÉ.

PRIMERA

Mediante el método cromatográfico desarrollado es posible identificar y cuantificar cafeína y teobromina, así como sus principales metabolitos (di- y mono-metilxantinas y ácidos metilúricos), con procesamiento mínimo de las muestras biológicas, observando la separación con buena resolución de 12 metilxantinas y ácidos metilúricos en plasma y orina.

SEGUNDA

Tras la ingesta de los productos solubles de cacao estudiados, teobromina y su derivado 7-metilxantina son las principales purinas presentes en plasma y orina, respectivamente. Al consumir un producto de cacao enriquecido en metilxantinas se observa una mayor concentración plasmática y excreción urinaria de metilxantinas y sus metabolitos derivados que tras consumir el cacao sin enriquecer, mostrando una relación dosis-dependiente. Estos resultados indican que el cacao en polvo es un alimento adecuado para enriquecer en estos compuestos bioactivos.

TERCERA

La cafeína es la principal metilxantina encontrada en el plasma de los voluntarios tras la toma del café mezcla de verde y tostado. Esta trimetilxantina es rápidamente absorbida, apareciendo en plasma desde los 30 minutos tras la ingesta. La cafeína es metabolizada casi en su totalidad a través de la ruta de la paraxantina, siendo esta dimetilxantina y el ácido 1-metilúrico los metabolitos mayoritarios en plasma y orina, respectivamente.

EFFECTOS DEL CACAO EN SALUD CARDIOVASCULAR.

PRIMERA

En el seno de una dieta equilibrada, la ingesta regular de cantidades realistas de un producto soluble de cacao enriquecido en flavanoles produce efectos cardioprotectores a través del aumento de los niveles séricos de HDL-colesterol tanto en sujetos sanos como hipercolesterolémicos, sin producir cambios sobre otros parámetros lipídicos, de inflamación, oxidación, presión arterial o antropométricos.

SEGUNDA

La ingesta sostenida y moderada de un producto soluble de cacao enriquecido en fibra dietética como parte de una dieta equilibrada mejora la salud cardiovascular en personas sanas e hipercolesterolémicas, induciendo el aumento de la concentración de HDL-colesterol, la bajada de la glicemia en ayunas, así como efectos anti-inflamatorios sin dar lugar a cambios antropométricos negativos como el aumento de peso. Estos resultados pueden atribuirse a su aportación de fibra dietética y flavanoles.

EFFECTOS DEL CAFÉ EN SALUD CARDIOVASCULAR.

PRIMERA

El consumo regular de cantidades realistas de un producto soluble de café mezcla de verde y tostado (35:65), rico en derivados hidroxicinámicos, produce efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular en individuos hipercolesterolémicos, reduciendo los niveles séricos de colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol y triglicéridos, sin producir cambios en los sujetos sanos. Además, la ingesta del producto de café estudiado disminuye la tensión arterial y la frecuencia cardíaca y aumenta la capacidad antioxidante en suero de todos los voluntarios, disminuyendo también el daño oxidativo a lípidos y proteínas. Así mismo, reduce los niveles de glucosa en ayunas tanto en el grupo de población sana como en el de riesgo cardiovascular, aumentando la sensibilidad a la insulina, según los índices HOMA y QUICKI. Sin embargo, apenas dio lugar a cambios sobre marcadores de inflamación, observándose una ligera mejora en los sujetos sanos y un descenso en la concentración de la proteína C reactiva en ambos grupos.

SEGUNDA

Sin modificar la ingesta y el gasto energético, el consumo de café redujo el peso, el porcentaje de grasa corporal y el índice de masa corporal tanto en sujetos normopeso, como en el grupo de población de riesgo cardiovascular. Estos resultados se pueden relacionar con el descenso de los niveles de grelina, resistina, leptina y PAI-1.

CONCLUSIONES GENERALES.

Tras el consumo de dosis realistas de cacao o café, las metilxantinas naturalmente presentes en estos alimentos, o suplementadas en un producto de cacao soluble, son altamente biodisponibles, siendo rápidamente absorbidas, extensivamente metabolizadas y altamente eliminadas a través de la orina.

El consumo prolongado de cantidades moderadas y realistas de los productos de cacao y café estudiados tiene un efecto beneficioso para la salud cardiovascular. En el caso del cacao principalmente a través del incremento de la concentración de HDL-colesterol, y en el del café por sus efectos hipotensivos, hipolipémicos, hipoglucémicos y antioxidantes, fundamentalmente, observándose además una acción positiva sobre la composición corporal relacionada con la menor secreción de hormonas digestivas y adipoquinas. Estos resultados indican que el consumo de estos alimentos es recomendable para la población en general, mostrando el café mezcla tostado/verde beneficios adicionales que permiten su recomendación a personas con sobrepeso o en las primeras fases de la diabetes tipo 2.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, R., Yano, K., Hakim, A., Burchfiel, C., Sharp, D., Rodriguez, B., & Curb, J. D. (1998). Changes in total and high-density lipoprotein cholesterol over 10-and 20-year periods (The Honolulu Heart Program). *The American Journal of Cardiology*, 82(2), 172-178.
- Acheson, K. J., Zahorska-Markiewicz, B., Pittet, P. H., Anantharaman, K., & Jequier, E. (1980). Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33(5), 989-997.
- Acosta, A. M., Escalona, M., Maiz, A., Pollak, F., & Leighton, F. (2002). Determinación del índice de resistencia insulínica mediante HOMA en una población de la Región Metropolitana de Chile. *Revista Médica de Chile*, 130(11), 1227-1231.
- Actis-Goretta, L., Lévêques, A., Giuffrida, F., Romanov-Michailidis, F., Viton, F., Barron, D., y cols. (2012). Elucidation of (–)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), 787-795.
- Adeney, K.L., Williams, M.A., Schiff, M.A. & Qiu, C., Sorensen, T.K. (2007). Coffee consumption and the risk of gestational diabetes mellitus. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 86(2), 161–166.
- Agardh, E. E., Carlsson, S., Ahlbom, A., Efendic, S., Grill, V., Hammar, N., y cols. (2004). Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. *Journal of Internal Medicine*, 255(6), 645-652.
- Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 71(10), 1397-1421.
- Akash, M. S. H., Pharm, K. R. B., & Chen, S. (2014). Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition*, 30(7-8), 755-763.
- Albarracín, S. L., Stab, B., Casas, Z., Sutachan, J. J., Samudio, I., Gonzalez, J., y cols. (2012). Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutritional Neuroscience*, 15(1), 1-9.

- Aldoori, W. H., Giovannucci, E. L., Rockett, H. R. H., Sampson, L., Rimm, E. B., & Willett, W. C. (1998). A prospective study of dietary fiber types and symptomatic diverticular disease in men. *The Journal of Nutrition*, 128(4), 714-719.
- Aldridge, A., Aranda, J. V., & Neims, A. H. (1979). Caffeine metabolism in the newborn. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 25(4), 447-453.
- Ali, F., Ismail, A., & Kersten, S. (2014). Molecular mechanisms underlying the potential antiobesity-related diseases effect of cocoa polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(1), 33-48.
- Almoosawi, S., Fyfe, L., Ho, C., & Al-Dujaili, E. (2010). The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *British Journal of Nutrition*, 103(6), 842-850.
- Alonso-Salces, R. M., Serra, F., Reniero, F., & Heberger, K. (2009). Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4224-4235.
- Andersen, L. F., Jacobs, D. R., Carlsen, M. H., & Blomhoff, R. (2006). Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(5), 1039-1046.
- Anderson, J. W., & Bridges, S. R. (1984). Short-chain fatty acid fermentation products of plant fiber affect glucose metabolism of isolated rat hepatocytes. *Experimental Biology and Medicine*, 177(2), 372-376.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., y cols. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188-205.
- Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G., & Garcia-Conesa, M. T. (2001). Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5679-5684.
- Andriantsitohaina, R., Auger, C., Chataigneau, T., Étienne-Selloum, N., Li, H., Martínez, M. C., y cols. (2012). Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *British Journal of Nutrition*, 108(9), 1532-1549.

- Andújar, I., Recio, M. C., Giner, R. M., & Ríos, J. L. (2012). Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. DOI: 10.1155/2012/906252.
- Ansar, S., Koska, J., & Reaven, P. D. (2011). Postprandial hyperlipidemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: focus on incretins. *Cardiovascular Diabetology*, 10(1), 61.
- Apgar, J. L., & Tarka, S. M. (1999). Methylxanthines. En: *Chocolate and Cocoa: Health and Nutrition*. Ed. I. Knight. Blackwell Science, Oxford, Inglaterra. Pp. 153–173.
- Appeldoorn, M. M., Vincken, J. P., Gruppen, H., & Hollman, P. C. (2009). Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *The Journal of Nutrition*, 139(8), 1469-1473.
- Arion, W. J., Canfield, W. K., Ramos, F. C., Schindler, P. W., Burger, H. J., Hemmerle, H., y cols. (1997). Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339(2), 315-322.
- Armstrong, L. E., Pumerantz, A. C., Roti, M., Judelson, D. A., Watson, G., Dias, J. C. y cols. (2005). Fluid, electrolyte, and renal indices of hydration during 11 days of controlled caffeine consumption. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 15(3), 252-265.
- Arnaud, M. J. (2011). Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. En: *Handbook of Experimental Pharmacology. Methylxanthines*, 200. Ed. B.B. Fredholm. Springer Berlin, Heidelberg, Alemania. Pp. 33-91.
- Ärnlöv, J., Vessby, B., & Risérus, U. (2004). Coffee consumption and insulin sensitivity. *The Journal of the American Medical Association*, 291(10), 1199-1201.
- Arranz, S., Valderas-Martinez, P., Chiva-Blanch, G., Casas, R., Urpi-Sarda, M., Lamuela-Raventos, R. M., & Estruch, R. (2013). Cardioprotective effects of cocoa: clinical evidence from randomized clinical intervention trials in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(6), 936-947.
- Arts, I. C., van de Putte, B., & Hollman, P. C. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1752-1757.

- Arvat, E., Di Vito, L., Broglio, F., Papotti, M., Muccioli, G., Dieguez, C., y cols. (2000). Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of Endocrinological Investigation*, 23(8), 493-495.
- Ascherio, A., Chen, H., Schwarzschild, M. A., Zhang, S. M., Colditz, G. A., & Speizer, F. E. (2003). Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. *Neurology*, 60(5), 790-795.
- Ascherio, A., Weisskopf, M. G., O'Reilly, E. J., McCullough, M. L., Calle, E. E., Rodriguez, C., & Thun, M. J. (2004). Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *American Journal of Epidemiology*, 160(10), 977-984.
- Astrup, A., Breum, L., Toubro, S., Hein, P., & Quaade, F. (1992). The effect and safety of an ephedrine/caffeine compound compared to ephedrine, caffeine and placebo in obese subjects on an energy restricted diet. A double blind trial. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 16(4), 269-277.
- Atia, N. N., York, P., & Clark, B. J. (2009). Development and validation of a rapid and efficient method for simultaneous determination of methylxanthines and their metabolites in urine using monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*, 32(7), 931-938.
- Aukrust, P., Berge, R. K., Ueland, T., Aaser, E., Damås, J. K., Wikeby, L., y cols. (2001). Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*, 37(2), 485-491.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., & Hadi, S. M. (2003). Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 9(9), BR325-330.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Muto, Y., Takizawa, T., & Terao, J. (2001). Absorption and urinary excretion of (-)-epicatechin after administration of different levels of cocoa powder or (-)-epicatechin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 6050-6056.

- Baba, S., Natsume, M., Yasuda, A., Nakamura, Y., Tamura, T., Osakabe, N., y cols. (2007a). Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo-and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *The Journal of Nutrition*, 137(6), 1436-1441.
- Baba, S., Osakabe, N., Kato, Y., Natsume, M., Yasuda, A., Kido, T., y cols. (2007b). Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(3), 709-717.
- Baker, J. A., Beehler, G. P., Sawant, A. C., Jayaprakash, V., McCann, S. E., & Moysich, K. B. (2006). Consumption of coffee, but not black tea, is associated with decreased risk of premenopausal breast cancer. *The Journal of Nutrition*, 136(1), 166-171.
- Bakuradze, T., Boehm, N., Janzowski, C., Lang, R., Hofmann, T., Stockis, J. P. y cols. (2011). Antioxidant-rich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and contributes to weight control: Results from an intervention study. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(4), 793–797.
- Bakuradze, T., Parra, G. A. M., Riedel, A., Somoza, V., Lang, R., Dieminger, N., y cols. (2014). Four weeks coffee consumption affects energy intake, satiety regulation, body fat, and protects DNA integrity. *Food Research International*. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.032.
- Ballard, K. D., Olive, J. L., & Swank, A. (2006). Metabolic Rate in Individuals with a Predisposition to Type 2 Diabetes: 1011: 2: 00 PM–2: 15 PM. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 38(5), S100-S101.
- Banqué, M., Raidó, B., Masuet, C., & Ramon, J. M. (2012). Food groups and nutrient intake and risk of colorectal cancer: a hospital-based case-control study in Spain. *Nutrition and Cancer*, 64(3), 386-392.
- Barbagallo, M., Dominguez, L. J., Galioto, A., Ferlisi, A., Cani, C., Malfa, L., y cols. (2003). Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(1), 39-52.
- Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2003). How do corticosteroids work in asthma? *Annals of Internal Medicine*, 139(5), 359-370.

- Beaudoin, M. S., & Graham, T. E. (2011). Methylxanthines and human health: epidemiological and experimental evidence. En: *Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology*, 200. Ed. B.B. Fredholm. Springer Berlin Heidelberg. Pp. 509-548.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bhaskar, S., & Rauf, A. A. (2009). Modulatory effect of coffee on platelet function. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(2), 141-148.
- Bingham, S. A., Day, N. E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., y cols. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet*, 361(9368), 1496-1501.
- Bohn, S. K., Ward, N. C., Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2012). Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. *Food and Function*, 3(6), 575-591.
- Bonati, M., Latini, R., Galletti, F., Young, J. F., Tognoni, G., & Garattini, S. (1982). Caffeine disposition after oral doses. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 32(1), 98-106.
- Bonita, J. S., Mandarano, M., Shuta, D., & Vinson, J. (2007). Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, 55(3), 187-198.
- Bonora, E., Moghetti, P., Zancanaro, C., Cigolini, M., Querena, M., Cacciatori, V., y cols. (1989). Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68(2), 374-378.
- Bory, C., Baltassat, P., Porthault, M., Bethenod, M., Frederich, A., & Aranda, J. V. (1979). Metabolism of theophylline to caffeine in premature newborn infants. *The Journal of Pediatrics*, 94(6), 988-993.
- Brachtel, D., & Richter, E. (1988). Effect of altered gastric emptying on caffeine absorption. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 26(5), 245-251.

- Bravi, F., Scotti, L., Bosetti, C., Gallus, S., Negri, E., La Vecchia, C., & Tavani, A. (2009). Coffee drinking and endometrial cancer risk: a metaanalysis of observational studies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(2), 130-135.
- Bravo, L., Abia, R., & Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481-1487.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 135-141.
- Bravo-Clemente, L., Sarriá Ruiz, B., Gómez Juaristi, M., Martínez López, S., & Mateos Briz, R. (2010). Potential benefits of green coffee consumption on health. *Alimentación Nutrición y Salud*, 17(3), 79-87.
- Breusing, N., Grune, T., Andrisic, L., Atalay, M., Bartosz, G., Biasi, F., y cols. (2010). An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Radicals Research*, 44(10), 1203-1215.
- Briel, M., Ferreira-Gonzalez, I., You, J. J., Karanickolas, P. J., Akl, E. A., Wu, P., y cols. (2009). Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *British Medical Journal*, 338 (b92), 522-526.
- Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W., & Sacks, F. M. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(1), 30-42.
- Bruinsma, K. A., & Taren, D. L. (2000). Dieting, essential fatty acid intake, and depression. *Nutrition Reviews*, 58(4), 98-108.
- Buijsse, B., Feskens, E. J., Kok, F. J., & Kromhout, D. (2006). Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Archives of Internal Medicine*, 166(4), 411-417.
- Burkitt, D. P. (1971). Possible relationships between bowel cancer and dietary habits. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 64(9), 964-965.

- Buscemi, S., Verga, S., Batsis, J. A., Tranchina, M. R., Belmonte, S., Mattina, A., y cols. (2009). Dose-dependent effects of decaffeinated coffee on endothelial function in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(10), 1200-1205.
- Buscemi, S., Verga, S., Batsis, J. A., Donatelli, M., Tranchina, M. R., Belmonte, S., y cols. (2010). Acute effects of coffee on endothelial function in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(5), 483-489.
- Cai, L., Ma, D., Zhang, Y., Liu, Z., & Wang, P. (2012). The effect of coffee consumption on serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(8), 872-877.
- Cano-Marquina, A., Tarín, J. J., & Cano, A. (2013). The impact of coffee on health. *Maturitas*, 75(1), 7-21.
- Cao, H. (2014). Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *Journal of Endocrinology*, 220(2), T47-T59.
- Cárdenas, C., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2011). Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *PloS One*, 6(8), e23407.
- Cardozo Jr, E. L., Ferrarese-Filho, O., Ferrarese, M. D. L. L., Donaduzzi, C. M., & Sturion, J. A. (2007). Methylxanthines and phenolic compounds in mate (< i> Ilex paraguariensis</i> St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 553-558.
- Carlin-Sindair, A., Marc, I., Menguy, L. & Prim, D. (2009). The determination of methylxanthines in chocolate and cocoa by different separation techniques: HPLC, Instrumental TLC, and MECC. *The Journal of Chemical Education*, 86(11), 1307-1310.
- Carnevale, R., Loffredo, L., Pignatelli, P., Nocella, C., Bartimoccia, S., Di Santo, S., y cols. (2012). Dark chocolate inhibits platelet isoprostanes via NOX2 down-regulation in smokers. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(1), 125-132.
- Carbajal, A. (2013). <https://www.ucm.es/innovadieta/encuestas>
- Casiglia, E., Spolaore, P., Inocchio, G., & Ambrosio, B. (1993). Unexpected effects of coffee consumption on liver enzymes. *European Journal of Epidemiology*, 9(3), 293-297.

- Cavin, C., Holzhaeuser, D., Scharf, G., Constable, A., Huber, W. W., & Schilter, B. (2002). Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and Chemical Toxicology*, 40(8), 1155-1163.
- Celermajer, D. S. (1997). Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *Journal of the American College of Cardiology*, 30(2), 325-333.
- Cesari, M., Penninx, B. W., Newman, A. B., Kritchevsky, S. B., Nicklas, B. J., Sutton-Tyrrell, K., y cols. (2003). Inflammatory markers and onset of cardiovascular events results from the Health ABC Study. *Circulation*, 108(19), 2317-2322.
- Chandalia, M., Garg, A., Lutjohann, D., von Bergmann, K., Grundy, S. M., & Brinkley, L. J. (2000). Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 342(19), 1392-1398.
- Chang, W. C., Chen, C. H., Lee, M. F., Chang, T., & Yu, Y. M. (2010). Chlorogenic acid attenuates adhesion molecules up-regulation in IL-1 β -treated endothelial cells. *European Journal of Nutrition*, 49(5), 267-275.
- Chapman, M. J., Assmann, G., Fruchart, J. C., Shepherd, J., & Sirtori, C. (2004). Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid-a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Current Medical Research and Opinion*, 20(8), 1253-1268.
- Chen, J. F., Xu, K., Petzer, J. P., Staal, R., Xu, Y. H., Beilstein, M., y cols. (2001). Neuroprotection by caffeine and A (2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, 21(10), 143-148.
- Cheng, W. S., Murphy, T. L., Smith, M. T., Cooksley, W. G. E., Halliday, J. W., & Powell, L. W. (1990). Dose-dependent pharmacokinetics of caffeine in humans: relevance as a test of quantitative liver function. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 47(4), 516-524.
- Cherniack, E. P. (2011). Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition*, 27(6), 617-623.
- Chiou, W. F., Chen, C. C., & Wei, B. L. (2009). 3, 4-Di-O-caffeoylquinic acid inhibits angiotensin-ii-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by downregulating the JNK and PI3K/AKT signaling pathways. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 27. DOI 10.1093/ecam/nep140.

- Cho, A. S., Jeon, S. M., Kim, M. J., Yeo, J., Seo, K. I., Choi, M. S., & Lee, M. K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 937-943.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo Jr, J. L y cols. (2003). The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. *Journal of American Medical Association*, 289(19), 2560-2571.
- Chou, T. M., & Benowitz, N. L. (1994). Caffeine and coffee: effects on health and cardiovascular disease. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 109(2), 173-189.
- Chu, Y. F., Brown, P. H., Lyle, B. J., Chen, Y., Black, R. M., Williams, C. E., y cols. (2009). Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9801-9808.
- Chu, Y. F., Chen, Y., Black, R. M., Brown, P. H., Lyle, B. J., Liu, R. H., & Ou, B. (2011). Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF- κ B inhibition, and stimulation of glucose uptake. *Food Chemistry*, 124(3), 914-920.
- Chu, Y. F. (Ed.). (2012). *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention* (Vol. 59). John Wiley & Sons, Oxford (Inglaterra).
- Cimini, A., Gentile, R., D'Angelo, B., Benedetti, E., Cristiano, L., Avantiaggiati, M. L., y cols. (2013). Cocoa powder triggers neuroprotective and preventive effects in a human Alzheimer's disease model by modulating BDNF signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(10), 2209-2220.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., y cols. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10), 3527-3561.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033-1043.
- Codex Alimentarius (2008). Informe de la 30ª Reunión del Comité del Codex Alimentarius sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales. Ciudad del Cabo (Sudáfrica), 3-7 noviembre 2008. ALINORM 09/32/36.

- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., & Williamson, G. (2008). Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 1-11.
- Cornelis, M. C., & El-Sohemy, A. (2007). Coffee, caffeine, and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology*, 18(1), 13-19.
- Corrêa, T. A., Rogero, M. M., Mito, B. M., Tarasoutchi, D., Tuda, V. L., César, L. A., & Torres, E. A. (2013). Paper-filtered coffee increases cholesterol and inflammation biomarkers independent of roasting degree: A clinical trial. *Nutrition*, 29(7), 977-981.
- Corti, R., Binggeli, C., Sudano, I., Spieker, L., Hänseler, E., Ruschitzka, F., y cols. (2002). Coffee acutely increases sympathetic nerve activity and blood pressure independently of caffeine content role of habitual versus nonhabitual drinking. *Circulation*, 106(23), 2935-2940.
- Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K., & Lüscher, T. F. (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, 119(10), 1433-1441.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.
- Crozier, A., Ashihara, H., & Tomás-Barbérán, F. (Eds.) (2011). *Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health*. John Wiley & Sons, Oxford (Inglaterra).
- Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E., & Weigle, D. S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50(8), 1714-1719.
- Curtis, P. J., Sampson, M., Potter, J., Dhatriya, K., Kroon, P. A., & Cassidy, A. (2012). Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes A 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care*, 35(2), 226-232.
- Cysneiros, R. M., Farkas, D., Harmatz, J. S., Von Moltke, L. L., & Greenblatt, D. J. (2007). Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between zolpidem and caffeine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82(1), 54-62.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342.

- Dahm, C. C., Keogh, R. H., Spencer, E. A., Greenwood, D. C., Key, T. J., Fentiman, I. S. y cols. (2010). Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case–control study using food diaries. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 614-626.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1), 23-38.
- Daly, J. W. (2007). Caffeine analogs: biomedical impact. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(16), 2153-2169.
- Davison, K., Coates, A. M., Buckley, J. D., & Howe, P. R. C. (2008). Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *International Journal of Obesity*, 32(8), 1289-1296.
- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., & Williamson, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters*, 436(1), 71-75.
- De Aragao, N. M., Veloso, M. C., Bispo, M. S., Ferreira, S. L., & de Andrade, J. B. (2005). Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 67(5), 1007-1013.
- De Kreutzenberg, S. V., Kiwanuka, E., Tiengo, A., & Avogaro, A. (2003). Visceral obesity is characterized by impaired nitric oxide-independent vasodilation. *European Heart Journal*, 24(13), 1210-1215.
- De Valk, H. W. (1999). Magnesium in diabetes mellitus. *The Netherlands Journal of Medicine*, 54(4), 139-146.
- De Vries, J. W. and the Dietary Fiber Scientific Review Committee Members (2001). The definition of dietary fiber. *Cereals Foods World*, 46(3), 112-126.
- Dekker, M. J., Gusba, J. E., Robinson, L. E., & Graham, T. E. (2007). Glucose homeostasis remains altered by acute caffeine ingestion following 2 weeks of daily caffeine consumption in previously non-caffeine-consuming males. *British Journal of Nutrition*, 98(3), 556-562.

- Desch, S., Schmidt, J., Kobler, D., Sonnabend, M., Eitel, I., Sareban, M., y cols. (2010). Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. *American Journal of Hypertension*, 23(1), 97-103.
- Dessí, M., Noce, A., Bertucci, P., Manca di Villahermosa, S., Zenobi, R., Castagnola, V., y cols. (2013). Atherosclerosis, dyslipidemia, and inflammation: the significant role of polyunsaturated fatty acids. *Inflammation*, 2013, 191823-191823.
- Di Castelnuovo, A., Di Giuseppe, R., Iacoviello, L., & de Gaetano, G. (2012). Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease. *European Journal of Internal Medicine*, 23 (1), 15-25.
- Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2007). Dietary fiber in brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1999-2003.
- Dikeman, C. L., & Fahey Jr, G. C. (2006). Viscosity as related to dietary fiber: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 649-663.
- Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X., & Girotra, S. (2006). Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutrition and Metabolism*, 3(1), 2-13.
- Do, G. M., Kwon, E. Y., Kim, H. J., Jeon, S. M., Ha, T. Y., Park, T., & Choi, M. S. (2008). Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(1), 55-59.
- Doherty, M., & Smith, P. M. (2004). Effects of caffeine ingestion on exercise testing: a meta-analysis. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 14(6), 626-646.
- Donahue, R., Bloom, E., Abbott, R., Reed, D., & Yano, K. (1987). Central obesity and coronary heart disease in men. *The Lancet*, 329(8537), 821-824.
- Doyle, M. E., & Egan, J. M. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 105-131.
- Drel, V. R., Mashtalir, N., Ilnytska, O., Shin, J., Li, F., Lyzogubov, V. V., & Obrosova, I. G. (2006). The leptin-deficient (ob/ob) mouse a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, 55 (12), 3335-3343.

- Du, H., Boshuizen, H. C., Forouhi, N. G., Wareham, N. J., Halkjær, J., Tjønneland, A., y cols. (2010). Dietary fiber and subsequent changes in body weight and waist circumference in European men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(2), 329-336.
- Duarte, J., Francisco, V., & Perez-Vizcaino, F. (2014). Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food and Function*. DOI: 10.1039/c4fo00144c.
- Duffy, S. J., Keaney Jr, J. F., Holbrook, M., Gokce, N., Swerdloff, P. L., Frei, B., & Vita, J. A. (2001). Short-and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104(2), 151-156.
- Durnin, J. V. G. A., & Womersley, J. V. G. A. (1974). Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *British Journal of Nutrition*, 32(1), 77-97.
- Echeverri, D., Montes, F. R., Cabrera, M., Galán, A., & Prieto, A. (2010). Caffeine's vascular mechanisms of action. *International Journal of Vascular Medicine*, 2010, 834060-834060.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *The Lancet*, 365(9468), 1415-1428.
- Ellam, S., & Williamson, G. (2013). Cocoa and human health. *Annual Review of Nutrition*, 33, 105-128.
- Elosua, R., Garcia, M., Aguilar, A., Molina, L., Covas, M. I., & Marrugat, J. (2000). Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish women. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(8), 1431-1437.
- Emara, S. (2004). Simultaneous determination of caffeine, theophylline and theobromine in human plasma by on-line solid-phase extraction coupled to reversed-phase chromatography. *Biomedical Chromatography*, 18(8), 479-485.
- Esposito, K., Nappo, F., Giugliano, G., Marfella, R. & Giugliano, D. (2003). Effect of dietary antioxidants on postprandial endothelial dysfunction induced by a high-fat meal in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(1), 139-143.

- Estruch, R., Sacanella, E., Badia, E., Antúnez, E., Nicolás, J. M., Fernández-Solá, J., y cols. (2004). Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial: effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*, 175(1), 117-123.
- Eteng, M. U., Eyong, E. U., Akpanyung, E. O., Agiang, M. A., & Aremu, C. Y. (1997). Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(3), 231-243.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation. *Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006* EFSA. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA Journal*, 2012, 10, 2809.
- Fallon, P. G., Jolin, H. E., Smith, P., Emson, C. L., Townsend, M. J., Fallon, R., y cols. (2002). IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity*, 17(1), 7-17.
- Fantuzzi, G. (2008). Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2), 326-330.
- Farag, N. H., Vincent, A. S., Sung, B. H., Whitsett, T. L., Wilson, M. F., & Lovallo, W. R. (2005). Caffeine tolerance is incomplete: persistent blood pressure responses in the ambulatory setting. *American Journal of Hypertension*, 18(5), 714-719.
- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C. M., & Lafay, S. (2008). Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *The Journal of Nutrition*, 138(12), 2309-2315.
- Feng, R., Lu, Y., Bowman, L. L., Qian, Y., Castranova, V., & Ding, M. (2005). Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 27888-27895.
- Fernández-Millán, E., Ramos, S., Álvarez, C., Bravo, L., Goya, L., & Martín, M.A. (2014). Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against oxidative stress via ERKs and PKC pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 66(4), 245-253.

- Fisher, N. D., Hughes, M., Gerhard-Herman, M., & Hollenberg, N. K. (2003). Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of Hypertension*, 21(12), 2281-2286.
- Flammer, A. J., Hermann, F., Sudano, I., Spieker, L., Hermann, M., Cooper, K. A., y cols. (2007). Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation*, 116(21), 2376-2382.
- Fogliano, V., & Morales, F. J. (2011). Estimation of dietary intake of melanoidins from coffee and bread. *Food and Function*, 2(2), 117-123.
- Forde, O. H., Knutsen, S. F., Arnesen, E., & Thelle, D. S. (1985). The Tromsø heart study: coffee consumption and serum lipid concentrations in men with hypercholesterolaemia: an randomised intervention study. *British Medical Journal (Clinical Research)*, 290(6472), 893-895.
- Fozard, J. R., & McCarthy, C. (2002). Adenosine receptor ligands as potential therapeutics in asthma. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 3(1), 69-77.
- Fraga, C. G., Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., Carrasquedo, F., Lotito, S. B., Lazarus, S., y cols. (2005). Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Journal of Immunology Research*, 12(1), 11-17.
- Fraga, C. G., Oteiza, P. I., & Galleano, M. (2014). In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 931-934.
- Freedman, J. E., Parker, C., Li, L., Perlman, J. A., Frei, B., Ivanov, V., y cols. (2001). Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*, 103(23), 2792-2798.
- Frost, G. S., Brynes, A. E., Dhillon, W. S., Bloom, S. R., & McBurney, M. I. (2003). The effects of fiber enrichment of pasta and fat content on gastric emptying, GLP-1, glucose, and insulin responses to a meal. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(2), 293-298.
- Frost-Meyer, N. J., & Logomarsino, J. V. (2012). Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 819-830.
- Fujioka, K., & Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, 106(1), 217-221.

- Fukushima, Y., Kasuga, M., Nakao, K., Shimomura, I., & Matsuzawa, Y. (2009). Effects of coffee on inflammatory cytokine gene expression in mice fed high-fat diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11100-11105.
- Galeone, C., Turati, F., La Vecchia, C., & Tavani, A. (2010). Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes and Control*, 21(11), 1949-1959.
- Galleano, M., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2009). Cocoa, chocolate, and cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 483-490.
- Gavrieli, A., Yannakoulia, M., Fragopoulou, E., Margaritopoulos, D., Chamberland, J. P., Kaisari, P., y cols. (2011). Caffeinated coffee does not acutely affect energy intake, appetite, or inflammation but prevents serum cortisol concentrations from falling in healthy men. *The Journal of Nutrition*, 141(4), 703-707.
- Gavrieli, A., Karfopoulou, E., Kardatou, E., Spyreli, E., Fragopoulou, E., Mantzoros, C. S., & Yannakoulia, M. (2013). Effect of different amounts of coffee on dietary intake and appetite of normal-weight and overweight/obese individuals. *Obesity*, 21(6), 1127-1132.
- Gee, J. M., DuPont, M. S., Rhodes, M. J., & Johnson, I. T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(1), 19-25.
- Gelatti, U., Covolo, L., Franceschini, M., Pirali, F., Tagger, A., Ribero, M. L., y cols. (2005). Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *Journal of Hepatology*, 42(4), 528-534.
- Georga, K. A., Samanidou, V. F., & Papadoyannis, I. N. (2001). Use of novel solid-phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin. *Journal of Chromatography B*, 759(2), 209-218.
- Giacco, R., Parillo, M., Rivellesse, A. A., Lasorella, G., Giacco, A., D'Episcopo, L., & Riccardi, G. (2000). Long-term dietary treatment with increased amounts of fiber-rich low-glycemic index natural foods improves blood glucose control and reduces the number of hypoglycemic events in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*, 23(10), 1461-1466.

- Giacco, R., Costabile, G., Della Pepa, G., Anniballi, G., Griffio, E., Mangione, A., y cols. (2014). A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. DOI: 10.1016/j.numecd.2014.01.007.
- Giménez-Bastida, J. A., Larrosa, M., González-Sarrias, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J. C., & García-Conesa, M. T. (2012). Intestinal ellagitannin metabolites ameliorate cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8866-8876.
- Ginsberg, G., Hattis, D., & Sonawane, B. (2004). Incorporating pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(2), 164-183.
- Giovannucci, E. (1998). Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *American Journal of Epidemiology*, 147(11), 1043-1052.
- Glass, C. K., & Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*, 104(4), 503-516.
- Gómez-Huelgas, R., Mancera-Romero, J., Bernal-Lopez, M. R., Jansen-Chaparro, S., Baca-Osorio, A. J., Toledo, E., y cols. (2011). Prevalence of cardiovascular risk factors in an urban adult population from southern Spain. IMAP Study. *International Journal of Clinical Practice*, 65(1), 35-40.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Leake, D. S., & Ames, J. M. (2007). In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6962-6969.
- González, R., Ballester, I., Lopez-Posadas, R., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., & Medina, F. S. D. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 331-362.
- González de Mejía, E., Song, Y. S., Ramirez-Mares, M. V., & Kobayashi, H. (2005). Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1966-1973.

- González-Castejón, M., & Rodríguez-Casado, A. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. *Pharmacological Research*, 64(5), 438-455.
- Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B., & Dawber, T. R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. *The American Journal of Medicine*, 62(5), 707-714.
- Goto, M., Takano-Ishikawa, Y., & Shinmoto, H. (2010). An in vitro effect of coffee on the antigen-specific immune responses of naive splenocytes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(2), 393-395.
- Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G., & Ferri, C. (2005a). Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(3), 611-614.
- Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G., & Ferri, C. (2005b). Reply to C. J. Kelly. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), 487-488.
- Grassi, D., Necozione, S., Lippi, C., Croce, G., Valeri, L., Pasqualetti, P., y cols. (2005c). Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension*, 46(2), 398-405.
- Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., y cols. (2008). Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *The Journal of Nutrition*, 138(9), 1671-1676.
- Grassi, D., Desideri, G., Croce, G., Tiberti, S., Aggio, A., & Ferri, C. (2009). Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Current Pharmaceutical Design*, 15(10), 1072-1084.
- Greenberg, J. A., Axen, K. V., Schnoll, R., & Boozer, C. N. (2005). Coffee, tea and diabetes: the role of weight loss and caffeine. *International Journal of Obesity*, 29(9), 1121-1129.
- Greenberg, J. A., Boozer, C. N., & Geliebter, A. (2006). Coffee, diabetes, and weight control. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 682-693.
- Greenberg, J. A., & Geliebter, A. (2012). Coffee, Hunger, and Peptide YY. *Journal of the American College of Nutrition*, 31(3), 160-166.

- Gremese, E., & Ferraccioli, G. (2011). The metabolic syndrome: the crossroads between rheumatoid arthritis and cardiovascular risk. *Autoimmunity Reviews*, 10(10), 582-589.
- Gu, L., Gonzalez, F. J., Kalow, W., & Tang, B. K. (1992). Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2(2), 73-77.
- Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., & Prior, R. L. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4057-4061.
- Gugliucci, A., & Bastos, D. H. M. (2009). Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. *Fitoterapia*, 80(2), 138-142.
- Gyntelberg, F., Hein, H. O., Suadicani, P., & Sørensen, H. (1995). Coffee consumption and risk of ischaemic heart disease—a settled issue? *Journal of Internal Medicine*, 237(1), 55-61.
- Habauzit, V., & Morand, C. (2012). Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 3(2), 87-106.
- Hackett, A. M. (1986). The metabolism of flavonoid compounds in mammals. En: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, Structure-Activity Relationships*. Ed. Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B. New York: Alan R. Liss, Inc. Pp. 177-197.
- Hackett, J., Telepchak, M. J., & Coyer, M. J. (2008). Analysis of total caffeine and other xanthines in specialty coffees using mixed mode solid-phase extraction and liquid chromatography-diode-array detection after microwave digestion. *Journal of Analytical Toxicology*, 32(8), 695-701.
- Hakim, I. A., Harris, R. B., & Weisgerber, U. M. (2000). Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: influence of type of tea beverages. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9(7), 727-731.
- Hammar, N., Andersson, T., Alfredsson, L., Reuterwall, C., Nilsson, T., Hallqvist, J., y cols. (2003). Association of boiled and filtered coffee with incidence of first nonfatal myocardial infarction: the SHEEP and the VHEEP study. *Journal of Internal Medicine*, 253(6), 653-659.

- Heckman, M. A., Weil, J., Mejia, D., & Gonzalez, E. (2010). Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *Journal of Food Science*, 75(3), R77-R87.
- Heiss, C., Finis, D., Kleinbongard, P., Hoffmann, A., Rassaf, T., Kelm, M., & Sies, H. (2007). Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 49 (2), 74-80.
- Heiss, C., Jahn, S., Taylor, M., Real, W. M., Angeli, F. S., Wong, M. L., y cols. (2010). Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(3), 218-224.
- Henriksen, E. J., Diamond-Stanic, M. K., & Marchionne, E. M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 993-999.
- Henry-Vitrac, C., Ibarra, A., Roller, M., Mérillon, J. M., & Vitrac, X. (2010). Contribution of chlorogenic acids to the inhibition of human hepatic glucose-6-phosphatase activity in vitro by Svetol, a standardized decaffeinated green coffee extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4141-4144.
- Hermann, F., Spieker, L. E., Ruschitzka, F., Sudano, I., Hermann, M., Binggeli, C., y cols. (2006). Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart*, 92(1), 119-120.
- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., y cols. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155(4), 381-386.
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 101-123.
- Hirose, K., Niwa, Y., Wakai, K., Matsuo, K., Nakanishi, T., & Tajima, K. (2007). Coffee consumption and the risk of endometrial cancer: Evidence from a case-control study of female hormone-related cancers in Japan. *Cancer Science*, 98(3), 411-415.

- Hoelzl, C., Knasmüller, S., Wagner, K. H., Elbling, L., Huber, W., Kager, N., y cols. (2010). Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(12), 1722-1733.
- Hollman, P. C., De Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1276-1282.
- Hollman, P. C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., y cols. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *The Journal of Nutrition*, 141(5), 989S-1009S.
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73-82.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., y cols. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 38-50.
- Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P. A., Cohn, J. S., Rimm, E. B., & Cassidy, A. (2012). Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(3), 740-751.
- Horvath, T. L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P. J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., y cols. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14875-14880.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444.

- Huang, J., de Paulis, T., & May, J. M. (2004). Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA. hy926 endothelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(12), 722-729.
- Hubert, H. B., Feinleib, M., McNamara, P. M., & Castelli, W. P. (1983). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 67(5), 968-977.
- Huxley, R., Lee, C. M. Y., Barzi, F., Timmermeister, L., Czernichow, S., Perkovic, V., y cols. (2009). Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, 169(22), 2053-2063.
- Ichihashi, K., Osawa, T., Toyokuni, S., & Uchida, K. (2001). Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes Implications for oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23903-23913.
- Jamaluddin, M. S., Weakley, S. M., Yao, Q., & Chen, C. (2012). Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 622-632.
- James, J. E. (1997). Is habitual caffeine use a preventable cardiovascular risk factor?. *The Lancet*, 349(9047), 279-281.
- James, J. E. (2004). Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. *Psychosomatic Medicine*, 66(1), 63-71.
- Jee, S. H., He, J., Whelton, P. K., Suh, I., & Klag, M. J. (1999). The effect of chronic coffee drinking on blood pressure a meta-analysis of controlled clinical trials. *Hypertension*, 33(2), 647-652.
- Jee, S. H., He, J., Appel, L. J., Whelton, P. K., Suh, I. I., & Klag, M. J. (2001). Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *American Journal of Epidemiology*, 153(4), 353-362.
- Jenkins, D. (1979). Dietary fibre, diabetes, and hyperlipidaemia: progress and prospects. *The Lancet*, 314(8155), 1287-1290.
- Jenkins, D. J., Jenkins, A. L., Wolever, T., Rao, A. V., & Thompson, L. U. (1986). Fiber and starchy foods: gut function and implications in disease. *American Journal of Gastroenterology*, 81(10), 920-930.

- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W.C., Vuksan, V., Vidgen, E., Wong, E., Agustin, L. S. A. y cols. (2000). Effect of cocoa bran on low-density lipoprotein oxidation and fecal bulking. *Archives of Internal Medicine*, 160(15), 2374-2379.
- Jensen, M. K., Koh-Banerjee, P., Franz, M., Sampson, L., Grønbæk, M., & Rimm, E. B. (2006). Whole grains, bran, and germ in relation to homocysteine and markers of glycemic control, lipids, and inflammation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 275-283.
- Jodynis-Liebert, J., Flieger, J., Matuszewska, A., & Juszczak, J. (2004). Serum metabolite/caffeine ratios as a test for liver function. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 44(4), 338-347.
- Johnston, K. L., Clifford, M. N., & Morgan, L. M. (2003). Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(4), 728-733.
- Jonkman, J. H. G., Van der Boon, W. J. V., Balant, L. P., & Le Cotonneq, J. Y. (1985). Food reduces the rate but not the extent of the absorption of theophylline from an aqueous solution. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 28(2), 225-227.
- Kalupahana, N. S., Moustaid-Moussa, N., & Claycombe, K. J. (2012). Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(1), 26-34.
- Kamimori, G. H., Joubert, A., Otterstetter, R., Santaromana, M., & Eddington, N. D. (1999). The effect of the menstrual cycle on the pharmacokinetics of caffeine in normal, healthy eumenorrheic females. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 55(6), 445-449.
- Kamimori, G. H., Karyekar, C. S., Otterstetter, R., Cox, D. S., Balkin, T. J., Belenky, G. L., & Eddington, N. D. (2002). The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics*, 234(1), 159-167.
- Kaplan, G. B., Greenblatt, D. J., Ehrenberg, B. L., Goddard, J. E., Cotreau, M. M., Harmatz, J. S., & Shader, R. I. (1997). Dose-dependent pharmacokinetics and psychomotor effects of caffeine in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 37(8), 693-703.

- Karatzis, E., Papaioannou, T. G., Aznaouridis, K., Karatzi, K., Stamatelopoulos, K., Zampelas, A., y cols. (2005). Acute effects of caffeine on blood pressure and wave reflections in healthy subjects: should we consider monitoring central blood pressure? *International Journal of Cardiology*, 98(3), 425-430.
- Kassis, A. N., Santosa, S., & Jones, P. J. H. (2009). Potential health claims on dietary fiber: How robust is the evidence. *International Journal of Nutrition and Metabolism*, 4(1), 28-32.
- Katcher, H. I., Legro, R. S., Kunselman, A. R., Gillies, P. J., Demers, L. M., Bagshaw, D. M., y cols. (2008). The effects of a whole grain-enriched hypocaloric diet on cardiovascular disease risk factors in men and women with metabolic syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(1), 79-90.
- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., & Quon, M. J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(7), 2402-2410.
- Keijzers, G. B., De Galan, B. E., Tack, C. J., & Smits, P. (2002). Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*, 25(2), 364-369.
- Kelly, C. J. (2005). Effects of theobromine should be considered in future studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), 486-487.
- Kempf, K., Herder, C., Erlund, I., Kolb, H., Martin, S., Carstensen, M., y cols. (2010). Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(4), 950-957.
- Keogh, J. B., McInerney, J., & Clifton, P. M. (2007). The effect of milk protein on the bioavailability of cocoa polyphenols. *Journal of Food Science*, 72(3), S230-S233.
- Kern, S. M., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P. A., & Garcia-Conesa, M. T. (2003). Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6050-6055.
- Kerry, N. L., & Abbey, M. (1997). Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 135(1), 93-102.

- Khan, N., Monagas, M., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2012). Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(12), 1046-1053.
- Khan, N., Khymenets, O., Urpí-Sardà, M., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Monagas, M., y cols. (2014). Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, 6(2), 844-880.
- Kim, H. G., Kim, J. Y., Hwang, Y. P., Lee, K. J., Lee, K. Y., Kim, D. H., y cols. (2006). The coffee diterpene kahweol inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(3), 332-341.
- Kim, J., Kim, J., Shim, J., Lee, C. Y., Lee, K. W., & Lee, H. J. (2013). Cocoa Phytochemicals: Recent Advances in Molecular Mechanisms on Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(11), 1458-1472.
- Kirchhoff, M., Torp-Pedersen, C., Hougaard, K., Jacobsen, T. J., Sjøøl, A., Munch, M., y cols. (1994). Casual blood pressure in a general Danish population. Relation to age, sex, weight, height, diabetes, serum lipids and consumption of coffee, tobacco and alcohol. *Journal of Clinical Epidemiology*, 47(5), 469-474.
- Klop, B., Elte, J. W. F., & Cabezas, M. C. (2013). Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 5(4), 1218-1240.
- Koenig, W. (2007). Atherosclerosis lab risk markers today: research and clinical application. *Clínica e Investigación en Aterosclerosis*, 19(5), 39-42.
- Koh, K. K., Han, S. H., & Quon, M. J. (2005). Inflammatory markers and the metabolic syndrome. Insights from therapeutic interventions. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(11), 1978-1985.
- Kokkonen, H., Söderström, I., Rocklöv, J., Hallmans, G., Lejon, K., & Rantapää Dahlqvist, S. (2010). Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 62(2), 383-391.
- Koleva, I. I., van Beek, T. A., Soffers, A. E., Dusemund, B., & Rietjens, I. M. (2012). Alkaloids in the human food chain—Natural occurrence and possible adverse effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(1), 30-52.

- Konishi, Y., Zhao, Z., & Shimizu, M. (2006). Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7539-7543.
- Kontush, A., & Chapman, M. J. (2006). Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 342-374.
- Koo, S. I., & Noh, S. K. (2007). Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(3), 179-183.
- Kot, M., & Daniel, W. A. (2008a). Relative contribution of rat cytochrome P450 isoforms to the metabolism of caffeine: the pathway and concentration dependence. *Biochemical Pharmacology*, 75(7), 1538-1549.
- Kot, M., & Daniel, W. A. (2008b). The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: An *in vitro* comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochemical Pharmacology*, 76(4), 543-551.
- Kothe, L., Zimmermann, B. F., & Galensa, R. (2013). Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. *Food Chemistry*, 141(4), 3656-3663.
- Kovacs, E. M., Lejeune, M. P., Nijs, I., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2004). Effects of green tea on weight maintenance after body-weight loss. *British Journal of Nutrition*, 91(3), 431-437.
- Kozuma, K., Tsuchiya, S., Kohori, J., Hase, T., & Tokimitsu, I. (2005). Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. *Hypertension Research*, 28(9), 711-718.
- Krauss, R. M., Winston, M., Fletcher, B. J., & Grundy, S. M. (1998). Obesity impact on cardiovascular disease. *Circulation*, 98(14), 1472-1476.
- Krebs, J. D., Parry-Strong, A., Weatherall, M., Carroll, R. W., & Downie, M. (2012). A cross-over study of the acute effects of espresso coffee on glucose tolerance and insulin sensitivity in people with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 61(9), 1231-1237.

- Kumazawa, T., Seno, H., Lee, X. P., Ishii, A., Watanabe-Suzuki, K., Sato, K., & Suzuki, O. (1999). Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 387(1), 53-60.
- Kurozawa, Y., Ogimoto, I., Shibata, A., Nose, T., Yoshimura, T., Suzuki, H., y cols. (2005). Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. *British Journal of Cancer*, 93(5), 607-610.
- Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noiro, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75(2), 223-230.
- Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301-311.
- Lakoski, S. G., Liu, Y., Brosnihan, K. B., & Herrington, D. M. (2008). Interleukin-10 concentration and coronary heart disease (CHD) event risk in the estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study. *Atherosclerosis*, 197(1), 443-447.
- Lane, J. D., Pieper, C. F., Phillips-Bute, B. G., Bryant, J. E., & Kuhn, C. M. (2002). Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. *Psychosomatic Medicine*, 64(4), 595-603.
- Lang, R., Dieminger, N., Beusch, A., Lee, Y. M., Dunkel, A., Suess, B., y cols. (2013). Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(26), 8487-8503.
- Langer, S., Marshall, L. J., Day, A. J., & Morgan, M. R. (2011). Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: a study of the correlation with nonfat cocoa solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8435-8441.
- Latini, R., Bonati, M., Gaspari, F., Traina, G. L., Jiritano, L., Bortolotti, A., y cols. (1984). II. Kinetics and metabolism of theobromine in male and female non-pregnant and pregnant rabbits. *Toxicology*, 30(4), 343-354.
- Lavie, C. J., Milani, R. V., & Ventura, H. O. (2009). Obesity and Cardiovascular Disease Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(21), 1925-1932.

- Lecoultre, V., Carrel, G., Egli, L., Binnert, C., Boss, A., MacMillan, E.L., Kreis, R., Boesch, C., Darimont, C., & Tappy, L. (2014). Coffee consumption attenuates short-term fructose-induced liver insulin resistance in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 268–275.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Ramos, S., Alía, M., Rúperez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2006). Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación. *Nutrición Hospitalaria*, 21(5), 622-628.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104(3), 948-954.
- Lee, C. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 295(1), 141-154.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (25), 7292-7295.
- Lee, K. J., Inoue, M., Otani, T., Iwasaki, M., Sasazuki, S., & Tsugane, S. (2007). Coffee consumption and risk of colorectal cancer in a population-based prospective cohort of Japanese men and women. *International Journal of Cancer*, 121(6), 1312-1318.
- Lelo, A., Miners, J. O., Robson, R., & Birkett, D. J. (1986). Assessment of caffeine exposure: caffeine content of beverages, caffeine intake, and plasma concentrations of methylxanthines. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 39(1), 54-59.
- Lewis, C. E., Cann, B., Funkhouser, E., Hilner, J. E., Bragg, C., Dyer, A., y cols. (1993). Inconsistent Associations of Caffeine-containing Beverages with Blood Pressure and with Lipoproteins The CARDIA Study. *American Journal of Epidemiology*, 138(7), 502-507.
- Li, B. W., Andrews, K. W., & Pehrsson, P. R. (2002). Individual sugars, soluble, and insoluble dietary fiber contents of 70 high consumption foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 715-723.

- Li, X. Y., Xu, L., Lin, G. S., Li, X. Y., Jiang, X. J., Wang, T., y cols. (2011). Protective effect of caffeine administration on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Shock*, 36(3), 289-294.
- Lichnovská, R., Gwozdziwiczová, S., & Hřebíček, J. (2002). Gender differences in factors influencing insulin resistance in elderly hyperlipemic non-diabetic subjects. *Cardiovascular Diabetology*, 1(1), 4-13.
- Liu, S., Willett, W. C., Manson, J. E., Hu, F. B., Rosner, B., & Colditz, G. (2003). Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(5), 920-927.
- Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Jauregui, O., Monagas, M., & Andres-Lacueva, C. (2009). An LC-MS-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after cocoa consumption. *Journal of Proteome Research*, 8(11), 5060-5068.
- Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Monagas, M., & Andres-Lacueva, C. (2013). Metabolomic fingerprint in patients at high risk of cardiovascular disease by cocoa intervention. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(6), 962-973.
- Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., McKinley, A. J., Puddey, I. B., & Croft, K. D. (2008). Pure dietary flavonoids quercetin and (–)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(4), 1018-1025.
- Loke, W. M., Proudfoot, J. M., Hodgson, J. M., McKinley, A. J., Hime, N., Magat, M., y cols. (2010). Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein e–knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(4), 749-757.
- Loopstra-Masters, R. C., Liese, A. D., Haffner, S. M., Wagenknecht, L. E., & Hanley, A. J. (2011). Associations between the intake of caffeinated and decaffeinated coffee and measures of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia*, 54(2), 320-328.
- López-García, E., van Dam, R. M., Qi, L., & Hu, F. B. (2006a). Coffee consumption and markers of inflammation and endothelial dysfunction in healthy and diabetic women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 888-893.

- López-García, E., van Dam, R. M., Willett, W. C., Rimm, E. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., y cols. (2006b). Coffee consumption and coronary heart disease in men and women a prospective cohort study. *Circulation*, 113(17), 2045-2053.
- López-García, E., Rodríguez-Artalejo, F., Rexrode, K. M., Logroscino, G., Hu, F. B., & van Dam, R. M. (2009). Coffee consumption and risk of stroke in women. *Circulation*, 119(8), 1116-1123.
- López-García, E., Rodríguez-Artalejo, F., Li, T. Y., Mukamal, K. J., Hu, F. B., & van Dam, R. M. (2011). Coffee consumption and mortality in women with cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(1), 218-224.
- López-García, E., Guallar-Castillon, P., Leon-Muñoz, L., Graciani, A., & Rodríguez-Artalejo, F. (2014). Coffee consumption and health-related quality of life. *Clinical Nutrition*, 33(1), 143-149.
- Ludwig, D. S., Pereira, M. A., Kroenke, C. H., Hilner, J. E., Van Horn, L., Slattery, M. L., & Jacobs Jr, D. R. (1999). Dietary fiber, weight gain, and cardiovascular disease risk factors in young adults. *The Journal of American Medical Association*, 282(16), 1539-1546.
- Ludwig, I. A., Clifford, M. N., Lean, M. E., Ashihara, H., & Crozier, A. (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food and Function*. DOI: 10.1039/c4fo00042k.
- Lundsberg, L. S. (1998). Caffeine consumption. En: *Caffeine*. Ed: G.A. Spiller. CRC Press, Boca Ratón, Florida (USA). Pp. 199-224.
- Ma, Y., Griffith, J. A., Chasan-Taber, L., Olendzki, B. C., Jackson, E., Stanek, E. J., y cols. (2006). Association between dietary fiber and serum C-reactive protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(4), 760-766.
- Ma, Y., Hébert, J. R., Li, W., Bertone-Johnson, E. R., Olendzki, B., Pagoto, S. L., y cols. (2008). Association between dietary fiber and markers of systemic inflammation in the Women's Health Initiative Observational Study. *Nutrition*, 24(10), 941-949.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-242S.
- Martín, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Granado Serrano, A. B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., & Goya, L. (2008). Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7765-7772.
- Martin, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2013). Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 336-351.
- Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L. & Bravo, L. (2005). Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*, 827(1), 76-82.
- Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S. M., & Jialal, I. (2002). Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3663-3667.
- Matsui, N., Ito, R., Nishimura, E., Yoshikawa, M., Kato, M., Kamei, M., y cols. (2005). Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition*, 21(5), 594-601.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- Mazza, G., & Miniati, E. (Eds.) (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. CRC press. Boca Raton, Florida (USA).
- McIntyre, A., Gibson, P. R., & Young, G. P. (1993). Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*, 34(3), 386-391.
- McKeown, N. M., Meigs, J. B., Liu, S., Wilson, P. W., & Jacques, P. F. (2002). Whole-grain intake is favorably associated with metabolic risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(2), 390-398.

- McLean, C. & Graham, T. E. (2002). Effects of exercise and thermal stress on caffeine pharmacokinetics in men and eumenorrheic women. *Journal of Applied Physiology*, 93(4), 1471-1478.
- McMullen, M. K., Whitehouse, J. M., Shine, G., & Towell, A. (2011). Habitual coffee and tea drinkers experienced increases in blood pressure after consuming low to moderate doses of caffeine; these increases were larger upright than in the supine posture. *Food and Function*, 2(3-4), 197-203.
- McTernan, C. L., McTernan, P. G., Harte, A. L., Levick, P. L., Barnett, A. H., & Kumar, S. (2002). Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *The Lancet*, 359(9300), 46-47.
- Meilahn, E. N., Cauley, J. A., Tracy, R. P., Macy, E. O., Gutai, J. P., & Kuller, L. H. (1996). Association of sex hormones and adiposity with plasma levels of fibrinogen and PAI-1 in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 143(2), 159-166.
- Mellor, D. D., Sathyapalan, T., Kilpatrick, E. S., Beckett, S., & Atkin, S. L. (2010). High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabetic Medicine*, 27(11), 1318-1321.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 801457-801457.
- Mensink, R. P., Lebbink, W. J., Lobbezoo, I. E., Wouw, M. P. W. V., Zock, P. L., & Katan, M. B. (1995). Diterpene composition of oils from Arabica and Robusta coffee beans and their effects on serum lipids in man. *Journal of Internal Medicine*, 237(6), 543-550.
- Mesas, A. E., Leon-Muñoz, L. M., Rodríguez-Artalejo, F., & López-García, E. (2011). The effect of coffee on blood pressure and cardiovascular disease in hypertensive individuals: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(4), 1113-1126.
- Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., McHale, N. L., Flanagan, J. A. y cols. (2006). Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4062-4068.

- Mills, C. E., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., & Spencer, J. P. (2013). The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chemistry*, 141(4), 3335-3340.
- Mitchell, E. S., Slettenaar, M., Transler, C., Jans, L., Quadts, F., & Berry, M. (2011). Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. *Physiology and Behaviour*, 104(5), 816-822.
- Moisey, L. L., Kacker, S., Bickerton, A. C., Robinson, L. E., & Graham, T. E. (2008). Caffeinated coffee consumption impairs blood glucose homeostasis in response to high and low glycemic index meals in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1254-1261.
- Monagas, M., Khan, N., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Llorach, R., y cols. (2009). Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(5), 1144-1150.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., y cols. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food and Function*, 1(3), 233-253.
- Montreau, F. R. (1972). Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la methode Folin-Ciocalteu. *Connaissance du Vigne et Vin*, 24, 397-404.
- Morales, F. J., Somoza, V., & Fogliano, V. (2012). Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, 42(4), 1097-1109.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L. & Cuadrado, C. (Eds.) (2009). *Tablas de Composición de Alimentos*. Ed. Pirámide. Madrid.
- Mostofsky, E., Rice, M. S., Levitan, E. B., & Mittleman, M. A. (2012). Habitual coffee consumption and risk of heart failure a dose-response meta-analysis. *Circulation: Heart Failure*, 5(4), 401-405.
- Moura-Nunes, N., Perrone, D., Farah, A., & Donangelo, C. M. (2009). The increase in human plasma antioxidant capacity after acute coffee intake is not associated with endogenous non-enzymatic antioxidant components. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(s6), 173-181.

- Mubarak, A., Bondonno, C. P., Liu, A. H., Considine, M. J., Rich, L., Mas, E., y cols. (2012). Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a randomized trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9130-9136.
- Mullen, W., Nemzer, B., Ou, B., Stalmach, A., Hunter, J., Clifford, M. N., & Combet, E. (2011). The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3754-3762.
- Mumford, G. K., Benowitz, N. L., Evans, S. M., Kaminski, B. J., Preston, K. L., Sannerud, C. A., y cols. (1996). Absorption rate of methylxanthines following capsules, cola and chocolate. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 51(3-4), 319-325.
- Muniyappa, R., Hall, G., Kolodziej, T. L., Karne, R. J., Crandon, S. K., & Quon, M. J. (2008). Cocoa consumption for 2 wk enhances insulin-mediated vasodilatation without improving blood pressure or insulin resistance in essential hypertension. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6), 1685-1696.
- Murase, T., Misawa, K., Minegishi, Y., Aoki, M., Ominami, H., Suzuki, Y., y cols. (2011). Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(1), E122-E133.
- Murphy, K. J., Chronopoulos, A. K., Singh, I., Frandis, M. A., Moriarty, H., Pike, M. J., y cols. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1466-1473.
- Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Rissanen, T. H., Virtanen, J. K., Kaikkonen, J., y cols. (2004). Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1351-1359.
- Mursu, J., Voutilainen, S., Numi, T., Alfthan, G., Virtanen, J. K., Rissanen, T. H., y cols. (2005). The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(4), 527-534.

- Naismith, D. J., Akinyanju, P. A., Szanto, S., & Yudkin, J. (1970). The effect in volunteers of coffee and decaffeinated coffee on blood glucose, insulin, plasma lipids and some factors involved in blood clotting. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 12(3), 144-151.
- Nakanishi, N., Nakamura, K., Nakajima, K., Suzuki, K., & Tatara, K. (2000). Coffee consumption and decreased serum γ -glutamyltransferase: a study of middle-aged Japanese men. *European Journal of Epidemiology*, 16(5), 419-423.
- Nakao, M., Ogura, Y., Satake, S., Ito, I., Iguchi, A., Takagi, K., & Nabeshima, T. (2002). Usefulness of soluble dietary fiber for the treatment of diarrhea during enteral nutrition in elderly patients. *Nutrition*, 18(1), 35-39.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5735-5741.
- Nardini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2007). Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets*, 18(3), 224-243.
- Narita, Y., & Inouye, K. (2009). Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas α -amylase isozymes I and II. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9218-9225.
- Natella, F., Nardini, M., Giannetti, I., Dattilo, C., & Scaccini, C. (2002). Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6211-6216.
- Natella, F., Nardini, M., Belevi, F., Pignatelli, P., Di Santo, S., Ghiselli, A., & cols. (2008). Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *British Journal of Nutrition*, 100(6), 1276-1282.
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*, 20(1), 1-30.
- Neufingerl, N., Zebregs, Y. E., Schuring, E. A., & Trautwein, E. A. (2013). Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(6), 1201-1209.

- Nielsen, S. E., Breinholt, V., Justesen, U., Cornett, C., & Dragsted, L. O. (1998). In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica*, 28(4), 389-401.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418-425.
- Njike, V. Y., Faridi, Z., Shuval, K., Dutta, S., Kay, C. D., West, S. G., y cols. (2011). Effects of sugar-sweetened and sugar-free cocoa on endothelial function in overweight adults. *International Journal of Cardiology*, 149(1), 83-88.
- Nogueira, L. D. P., Knibel, M. P., Torres, M. R. S. G., Nogueira Neto, J. F., & Sanjuliani, A. F. (2012). Consumption of high-polyphenol dark chocolate improves endothelial function in individuals with stage 1 hypertension and excess body weight. *International Journal of Hypertension*, 2012. doi:10.1155/2012/147321.
- Noordzij, M., Uiterwaal, C. S., Arends, L. R., Kok, F. J., Grobbee, D. E., & Geleijnse, J. M. (2005). Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Hypertension*, 23(5), 921-928.
- Nurminen, M. L., Niittynen, L., Korpela, R., & Vapaatalo, H. (1999). Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(11), 831-839.
- Ochiai, R., Jokura, H., Suzuki, A., Tokimitsu, I., Ohishi, M., Komai, N., y cols. (2004). Green coffee bean extract improves human vasoreactivity. *Hypertension Research*, 27(10), 731-737.
- Ochiai, R., Chikama, A., Kataoka, K., Tokimitsu, I., Maekawa, Y., Ohishi, M., y cols. (2009). Effects of hydroxyhydroquinone-reduced coffee on vasoreactivity and blood pressure. *Hypertension Research*, 32(11), 969-974.
- Ohnaka, K., Ikeda, M., Maki, T., Okada, T., Shimazoe, T., Adachi, M., y cols. (2012). Effects of 16-week consumption of caffeinated and decaffeinated instant coffee on glucose metabolism in a randomized controlled trial. *Journal of Nutrition and Metabolism*. DOI:10.1155/2012/207426.

- Okano, J. I., Nagahara, T., Matsumoto, K., & Murawaki, Y. (2008). Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 102(6), 543-551.
- O'Keefe, J. H., Bhatti, S. K., Patil, H. R., DiNicolantonio, J. J., Lucan, S. C., & Lavie, C. J. (2013). Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(12), 1043-1051.
- Oliveira, D. M., Freitas, H. S., Souza, M. F., Arcari, D. P., Ribeiro, M. L., Carvalho, P. O., & Bastos, D. H. (2008). Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10527-10532.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., & Katan, M. B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, 131(1), 66-71.
- Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. H. (2012). Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: a contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. *PloS One*, 7(3), e32718, 1-11.
- Onakpoya, I., Terry, R., & Ernst, E. (2010). The use of green coffee extract as a weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Gastroenterology Research and Practice*, 2011, 128-129.
- Otake, T., Fukumoto, J., Abe, M., Takemura, S., Mihn, P. N., Mizoue, T., & Kiyohara, C. (2014). Linking lifestyle factors and insulin resistance, based on fasting plasma insulin and HOMA-IR in middle-aged Japanese men: A cross-sectional study. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 1-10.
- Pan, M. H., Lai, C. S., & Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*, 1(1), 15-31.
- Paolisso, G., Sgambato, S., Gambardella, A., Pizza, G., Tesauro, P., Varricchio, M., y cols. (1992). Daily magnesium supplements improve glucose handling in elderly subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(6), 1161-1167.
- Papamichael, C. X., Aznaouridis, K. X., Karatzis, E. X., Karatzi, K. X., Stamatelopoulos, K. X., Vamvakou, G., y cols. (2005). Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clinical Science*, 109(1), 55-60.

- Park, J. B. (2009). 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid orally administered suppress P-selectin expression on mouse platelets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10), 800-805.
- Paur, I., Balstad, T. R., Kolberg, M., Pedersen, M. K., Austenaa, L. M., Jacobs, D. R., & Blomhoff, R. (2010). Extract of Oregano, Coffee, Thyme, Clove, and Walnuts Inhibits NF- κ B in Monocytes and in Transgenic Reporter Mice. *Cancer Prevention Research*, 3(5), 653-663.
- Pereira, M. A., O'Reilly, E., Augustsson, K., Fraser, G. E., Goldbourt, U., Heitmann, B. L., y cols. (2004). Dietary fiber and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of cohort studies. *Archives of Internal Medicine*, 164(4), 370-376.
- Perera, V., Gross, A. S., Xu, H., & McLachlan, A. J. (2011). Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(9), 1161-1168.
- Persson, I. A. L., Persson, K., Hägg, S., & Andersson, R. G. (2011). Effects of cocoa extract and dark chocolate on angiotensin-converting enzyme and nitric oxide in human endothelial cells and healthy volunteers—a nutrigenomics perspective. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57(1), 44-50.
- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Jacques, P. F., & McCullough, M. L. (2012). Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutrition Reviews*, 70(9), 491-508.
- Pham, N. M., Nanri, A., Yasuda, K., Kurotani, K., Kuwahara, K., Akter, S., y cols. (2014). Habitual consumption of coffee and green tea in relation to serum adipokines: a cross-sectional study. *European Journal of Nutrition*. DOI: 10.1007/s00394-014-0701-4.
- Poikolainen, K., & Vartiainen, E. (1997). Determinants of γ -glutamyltransferase: positive interaction with alcohol and body mass index, negative association with coffee. *American Journal of Epidemiology*, 146(12), 1019-1024.
- Porrini, M., & Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(10), 647-650.

- Ptolemy, A. S., Tzioumis, E., Thomke, A., Rifai, S., & Kellogg, M. (2010). Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies. *Journal of Chromatography B*, 878(3), 409-416.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Rafecas, M. & Codony, R. (2000). Estudio nutricional del cacao y productos derivados. En: *Informe del Instituto del Cacao y el Chocolate*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Ramiro, E., Franch, À., Castellote, C., Pérez-Cano, F., Permanyer, J., Izquierdo-Pulido, M., & Castell, M. (2005). Flavonoids from Theobroma cacao down-regulate inflammatory mediators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8506-8511.
- Ramli, N., Yatim, A. M., Said, M., & Hok, H. C. (2001). HPLC determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 7(2), 377-386.
- Ranheim, T., & Halvorsen, B. (2005). Coffee consumption and human health—beneficial or detrimental?—Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(3), 274-284.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rebello, S. A., Chen, C. H., Naidoo, N., Xu, W., Lee, J., Chia, K. S., y cols. (2011). Coffee and tea consumption in relation to inflammation and basal glucose metabolism in a multi-ethnic Asian population: a cross-sectional study. *Nutrition Journal*, 10(1), 61.
- Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., & Keen, C. L. (2000). Cocoa inhibits platelet activation and function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(1), 30-35.

- Reissig, C. J., Strain, E. C., & Griffiths, R. R. (2009). Caffeinated energy drinks—a growing problem. *Drug and Alcohol Dependence*, 99(1), 1-10.
- Renaud, S. D., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Renouf, M., Guy, P. A., Marmet, C., Fraering, A. L., Longet, K., Moulin, J., y cols. (2010a). Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: small intestine and colon are key sites for coffee metabolism. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(6), 760-766.
- Renouf, M., Marmet, C., Guy, P., Fraering, A. L., Longet, K., Moulin, J., y cols. (2010b). Nondairy creamer, but not milk, delays the appearance of coffee phenolic acid equivalents in human plasma. *The Journal of Nutrition*, 140(2), 259-263.
- Renouf, M., Marmet, C., Giuffrida, F., Lepage, M., Barron, D., Beaumont, M., y cols. (2014). Dose–response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(2), 301-309.
- Richelle, M., Tavazzi, I., & Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3438-3442.
- Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E., & Rifai, N. (2000a). C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New England Journal of Medicine*, 342(12), 836-843.
- Ridker, P. M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., & Braunwald, E. (2000b). Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*, 101(18), 2149-2153.
- Riksen, N. P., Rongen, G. A., & Smits, P. (2009). Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: implications for coronary heart disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(2), 185-191.
- Riksen, N. P., Smits, P., & Rongen, G. A. (2011). The cardiovascular effects of methylxanthines. En: *Handbook of Experimental Pharmacology. Methylxanthines*, 200. Ed. B.B. Fredholm. Springer Berlin, Heidelberg (Alemania). Pp. 413-437.

- Rios, L. Y., Gonthier, M. P., Rémésy, C., Mila, I., Lapierre, C., Lazarus, S. A., y cols. (2003). Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(4), 912-918.
- Ritcher, S., Wehr, N. B., Stadtman, E. R. & Levine, R.L. (2002). Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 430-432.
- Robson, R. A. (1992). The effects of quinolones on xanthine pharmacokinetics. *The American Journal of Medicine*, 92(4), S22-S25.
- Rodopoulos, N., & Norman, A. (1994). Determination of caffeine and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 54(4), 305-315.
- Rodopoulos, N., Wisen, O., & Norman, A. (1995). Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 55(3), 229-242.
- Rodopoulos, N., Höjvall, L., & Norman, A. (1996). Elimination of theobromine metabolites in healthy adults. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 56(4), 373-383.
- Rodopoulos, N., & Norman, A. (1996). Assessment of dimethylxanthine formation from caffeine in healthy adults: comparison between plasma and saliva concentrations and urinary excretion of metabolites. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 56(3), 259-268.
- Rodopoulos, N., & Norman, A. (1997). Elimination of theophylline metabolites in healthy adults. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 57(3), 233-240.
- Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovitch, H., Morens, D. M., Grandinetti, A., Tung, K. H., y cols. (2000). Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *Journal of American Medical Association*, 283(20), 2674-2679.
- Ruiz-Roso, B., Quintela, J. C., de la Fuente, E., Haya, J., & Pérez-Olleros, L. (2010). Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(1), 50-56.

- Rus, H. G., Vlaicu, R., & Niculescu, F. (1996). Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis*, 127(2), 263-271.
- Rusconi, M., & Conti, A. (2010). Theobroma cacao L., the food of the gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61(1), 5-13.
- Sacanella, E., Vazquez-Agell, M., Mena, M. P., Antúnez, E., Fernández-Solá, J., Nicolás, J. M., y cols. (2007). Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(5), 1463-1469.
- Salazar-Martinez, E., Willett, W. C., Ascherio, A., Manson, J. E., Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2004). Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, 140(1), 1-8.
- Salmerón, J., Ascherio, A., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Spiegelman, D., Jenkins, D. J., y cols. (1997a). Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care*, 20(4), 545-550.
- Sánchez, D., Quiñones, M., Moulay, L., Muguerza, B., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2010). Changes in arterial blood pressure of a soluble cocoa fiber product in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1493-1501.
- Sarriá, B., Mateos, R., Sierra-Cinos, J. L., Goya, L., García-Diz, L., & Bravo, L. (2012). Hypotensive, hypoglycaemic and antioxidant effects of consuming a cocoa product in moderately hypercholesterolemic humans. *Food and Function*, 3(8), 867-874.
- Sattar, N., Murray, H. M., Welsh, P., Blauw, G. J., Buckley, B. M., Cobbe, S., y cols. (2009). Are markers of inflammation more strongly associated with risk for fatal than for nonfatal vascular events?. *PLoS Medicine*, 6(6), e1000099.
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4303-4306.
- Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goni, I., & Bravo, L. (2000). In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3342-3347.

- Saura-Calixto, F. D., & Goñi, I. (2004). The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(7), 1078-1082.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schenker, S., Heinemann, C., Huber, M., Pompizzi, R., Perren, R., & Escher, R. (2002). Impact of roasting conditions on the formation of aroma compounds in coffee beans. *Journal of Food Science*, 67(1), 60-66.
- Schmidt, B., Roberts, R. S., Davis, P., Doyle, L. W., Barrington, K. J., Ohlsson, A. y cols. (2006). Caffeine therapy for apnea of prematurity. *New England Journal of Medicine*, 354(20), 2112-2121.
- Schneider, H., Ma, L., & Glatt, H. (2003). Extractionless method for the determination of urinary caffeine metabolites using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 789(2), 227-237.
- Scholey, A. B., French, S. J., Morris, P. J., Kennedy, D. O., Milne, A. L., & Haskell, C. F. (2010). Consumption of cocoa flavanols results in acute improvements in mood and cognitive performance during sustained mental effort. *Journal of Psychopharmacology*, 24(10), 1505-1514.
- Schramm, D. D., Wang, J. F., Holt, R. R., Ensunsa, J. L., Gonsalves, J. L., Lazarus, S. A., y cols. (2001). Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(1), 36-40.
- Schramm, D. D., Karim, M., Schrader, H. R., Holt, R. R., Kirkpatrick, N. J., Polagruto, J. A., y cols. (2003). Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sciences*, 73(7), 857-869.
- Schreiber-Deturmeny, E. & Bruguerolle, B. (1996). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of caffeine and theophylline for routine drug monitoring in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 677(2), 305-312.

- Scott, R. W. (1979). Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical chemistry*, 51(7), 936-941.
- Serafini, M., Bugianesi, R., Maiani, G., Valtuena, S., De Santis, S., & Crozier, A. (2003). Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, 424(6952), 1013-1013.
- Setty, A. R., Curhan, G., & Choi, H. K. (2007). Obesity, waist circumference, weight change, and the risk of psoriasis in women: Nurses' Health Study II. *Archives of Internal Medicine*, 167(15), 1670-1675.
- Shechter, M., Shalmon, G., Scheinowitz, M., Koren-Morag, N., Feinberg, M. S., Harats, D., y cols. (2011). Impact of acute caffeine ingestion on endothelial function in subjects with and without coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*, 107(9), 1255-1261.
- Shi, X., Dalal, N. S., & Jain, A. C. (1991). Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food and Chemical Toxicology*, 29(1), 1-6.
- Shively, C. A., Tarka, S. M., Arnaud, M. J., Dvorchik, B. H., Passananti, G. T., & Vesell, E. S. (1985). High levels of methylxanthines in chocolate do not alter theobromine disposition. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 37(4), 415-424.
- Shrime, M. G., Bauer, S. R., McDonald, A. C., Chowdhury, N. H., Coltart, C. E., & Ding, E. L. (2011). Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a meta-analysis of short-term studies. *The Journal of Nutrition*, 141(11), 1982-1988.
- Silva, J. A., Borges, N., Santos, A., & Alves, A. (2012). Method validation for cafestol and kahweol quantification in coffee brews by HPLC-DAD. *Food Analytical Methods*, 5(6), 1404-1410.
- Silván, J. M., Morales, F. J., & Saura-Calixto, F. (2010). Conceptual study on Maillardized dietary fiber in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12244-12249.
- Siri, W. E. (1961). Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. En: *Techniques for Measuring Body Composition*. Ed. J. Brozek & A. Herschel. National Research Council. Washington, DC. Pp. 223-44.
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N. S., Cekanova, M., LeMieux, M., Greer, B., & Moustaid-Moussa, N. (2013). Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(4), 613-623.

- Smit, H. J., Gaffan, E. A., & Rogers, P. J. (2004). Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology*, 176 (3-4), 412-419.
- Smit, H. J. (2011). Theobromine and the pharmacology of cocoa. En: *Handbook of Experimental Pharmacology. Methylxanthines*, 200. Ed. B.B. Fredholm. Springer Berlin, Heidelberg (Alemania). Pp. 201-234.
- Sofi, F., Conti, A. A., Gori, A. M., Elia, L., Casini, A., Abbate, R., & Gensini, G. F. (2007). Coffee consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(3), 209-223.
- Sorond, F. A., Lipsitz, L. A., Hollenberg, N. K., & Fisher, N. D. (2008). Cerebral blood flow response to flavanol-rich cocoa in healthy elderly humans. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(2), 433.
- Southgate, D. A. T. (1977). The definition and analysis of dietary fibre. *Nutrition Reviews*, 35(3), 31-37.
- Southgate, D. A. (1987). Minerals, trace elements, and potential hazards. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 45(5), 1256-1266.
- Spiller, M. A. (1998). The chemical components of coffee. En: *Caffeine*. Ed. G. A. Spiller. CRC Press, Boca Ratón, Florida (USA). Pp. 97-161.
- Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, C., y cols. (2009). Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(8), 1749-1758.
- Stalmach, A., Williamson, G., & Crozier, A. (2014). Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. *Food and Function*. DOI: 10.1039/c4fo00316k.
- Steinberg, F. M., Holt, R. R., Schmitz, H. H., & Keen, C. L. (2002). Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(11), 645-652.
- Steinberg, F. M., Bearden, M. M., & Keen, C. L. (2003). Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(2), 215-223.

- Steinmetz, K. A., & Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(10), 1027-1039.
- Stote, K. S., Clevidence, B. A., Novotny, J. A., Henderson, T., Radecki, S. V., & Baer, D. J. (2012). Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(10), 1153-1159.
- Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P., & Tukey, R. H. (1998). Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Molecular Pharmacology*, 54(4), 647-654.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333-1346.
- Suzuki, A., Kagawa, D., Ochiai, R., Tokimitsu, I., & Saito, I. (2002). Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25(1), 99-107.
- Suzuki, A., Yamamoto, N., Jokura, H., Yamamoto, M., Fujii, A., Tokimitsu, I., & Saito, I. (2006). Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 24(6), 1075-1082.
- Svilaas, A., Sakhi, A. K., Andersen, L. F., Svilaas, T., Ström, E. C., Jacobs, D. R., y cols. (2004). Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 562-567.
- Tabernero, M., Serrano, J., & Saura-Calixto, F. (2007). Dietary fiber intake in two European diets with high (Copenhagen, Denmark) and low (Murcia, Spain) colorectal cancer incidence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9443-9449.
- Taddei, S., & Salvetti, A. (2002). Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. *Journal of Hypertension*, 20(9), 1671-1674.
- Tangney, C. C., & Rasmussen, H. E. (2013). Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 15(5), 1-10.
- Tarka, S. M., Arnaud, M. J., Dvorchik, B. H., & Vesell, E. S. (1983). Theobromine kinetics and metabolic disposition. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 34(4), 546-555.

- Tarpila, A., Wennberg, T., & Tarpila, S. (2005). Flaxseed as a functional food. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 3(3), 167.
- Tassaneeyakul, W., Birkett, D. J., McManus, M. E., Tassaneeyakul, W., Veronese, M. E., Andersson, T., y cols. (1994). Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochemical Pharmacology*, 47(10), 1767-1776.
- Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., Jung, N., & Schömig, E. (2007). Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *Journal of American Medical Association*, 298(1), 49-60.
- Tchernof, A., Nolan, A., Sites, C. K., Ades, P. A., & Poehlman, E. T. (2002). Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation*, 105(5), 564-569.
- Teekachunhatean, S., Tosri, N., Rojanasthien, N., Srichairatanakool, S., & Sangdee, C. (2013). Pharmacokinetics of caffeine following a single administration of coffee enema versus oral coffee consumption in healthy male subjects. *Pharmacology*. DOI: [10.1155/2013/147238](https://doi.org/10.1155/2013/147238).
- Thelle, D. S., & Strandhagen, E. (2005). Coffee and disease: an overview with main emphasis on blood lipids and homocysteine. *Food and Nutrition Research*, 49(2), 50-61.
- Thevis, M., Opfermann, G., Krug, O. & Schänzer, W. (2004). Electrospray ionization mass spectrometric characterization and quantitation of xanthine derivatives using isotopically labelled analogues: an application for equine doping control analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(14), 1553-1560.
- Thom, E. (2007). The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *Journal of International Medical Research*, 35(6), 900-908.
- Thompson, M., Williams, C. R., & Elliot, G. E. P. (1976). Stability of flavonoid complexes of copper (II) and flavonoid antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 85(2), 375-381.
- Tian, C., Wang, W., Hong, Z., & Zhang, X. (2013). Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a dose-response analysis of observational studies. *Cancer Causes and Control*, 24(6), 1265-1268.

- Tijburg, L., Wiseman, S. A., W Meijer, G., & Weststrate, J. A. (1997). Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis*, 135(1), 37-47.
- Tillotson, J. L., Grandits, G. A., Bartsch, G. E., & Stamler, J. (1997). Relation of dietary fiber to blood lipids in the special intervention and usual care groups in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(1), 327S-337S.
- Toda, S., Kumura, M., & Ohnishi, M. (1991). Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Medica*, 57(1), 8-10.
- Tokede, O. A., Gaziano, J. M., & Djoussé, L. (2011). Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65(8), 879-886.
- Torre, M., Rodriguez, A. R., & Saura-Calixto, F. (1991). Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(1), 1-22.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Corella, D., y cols. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(10), 953-959.
- Trikudanathan, S., Raji, A., Chamarthi, B., Seely, E. W., & Simonson, D. C. (2013). Comparison of insulin sensitivity measures in South Asians. *Metabolism*, 62(10), 1448-1454.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Tsioufis, C., Dimitriadis, K., Vasiliadou, C., Taxiarchou, E., Vezali, E., Tsiamis, E., y cols. (2006). Heavy coffee consumption in conjunction with smoking is accompanied by increased inflammatory processes and impaired thrombosis/fibrinolysis system in essential hypertensive subjects. *Journal of Human Hypertension*, 20(6), 470-472.
- Tunland, B. C., & Meyer, D. (2002). Nondigestible oligo-and polysaccharides (Dietary Fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3), 90-109.

- Tunnidiffe, J. M., & Shearer, J. (2008). Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 33(6), 1290-1300.
- Tzanavaras, P. D., Zacharis, C. K., & Themelis, D. G. (2010). Rapid determination of methylxanthines in real samples by high-performance liquid chromatography using the new FastGradient® narrow-bore monolithic column. *Talanta*, 81(4), 1494-1501.
- Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G. R., Kwik-Urbe, C., & Spencer, J. P. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 62-72.
- Ullrich, D., Compagnone, D., Münch, B., Brandes, A., Hille, H., & Bircher, J. (1992). Urinary caffeine metabolites in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 43(2), 167-172.
- Urgert, R., & Katan, M. B. (1997). The cholesterol-raising factor from coffee beans. *Annual Review of Nutrition*, 17(1), 305-324.
- Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Llorach, R., Lamuela-Raventós, R. M., Jáuregui, O., y cols. (2009). Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7258-7267.
- Urpi-Sarda, M., Llorach, R., Khan, N., Monagas, M., Rotches-Ribalta, M., Lamuela-Raventós, R., y cols. (2010). Effect of milk on the urinary excretion of microbial phenolic acids after cocoa powder consumption in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4706-4711.
- Urpi-Sarda, M., Llorach, R., Monagas, M., Khan, N., Rotches-Ribalta, M., Roura Carvajal, E., y cols. (2011). Effect of cocoa powder in the prevention of cardiovascular disease: biological, consumption and inflammatory biomarkers. A metabolomic approach. En: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 5, Ed: D. Muñoz-Torrero. Transworld Research Network, Kerala (India). Pp. 121-132.
- Usmani, O. S., Belvisi, M. G., Patel, H. J., Crispino, N., Birrell, M. A., Korbonits, M., y cols. (2005). Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *The FASEB Journal*, 19(2), 231-233.

- Uto-Kondo, H., Ayaori, M., Ogura, M., Nakaya, K., Ito, M., Suzuki, A., y cols. (2010). Coffee consumption enhances high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in macrophages. *Circulation Research*, 106(4), 779-787.
- Van Dam, R. M., Dekker, J. M., Nijpels, G., Stehouwer, C. D. A., Bouter, L. M., & Heine, R. J. (2004). Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Diabetologia*, 47(12), 2152-2159.
- Van Dam, R. M., & Hu, F. B. (2005). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Journal of American Medical Association*, 294(1), 97-04.
- Van Dam, R. M. (2006). Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(1), 69-77.
- van Dam, R. M., Naidoo, N., & Landberg, R. (2013). Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. *Current Opinion in Lipidology*, 24(1), 25-33.
- Van den Bogaard, B., Draijer, R., Westerhof, B. E., van den Meiracker, A. H., van Montfrans, G. A., & van den Born, B. J. H. (2010). Effects on peripheral and central blood pressure of cocoa with natural or high-dose theobromine a randomized, double-blind crossover trial. *Hypertension*, 56(5), 839-846.
- Van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A., & Jongen, W. M. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3606-3613.
- Van Rooij, J., Van der Stegen, G. H., Schoemaker, R. C., Kroon, C., Burggraaf, J., Hollaar, L., y cols. (1995). A placebo-controlled parallel study of the effect of two types of coffee oil on serum lipids and transaminases: identification of chemical substances involved in the cholesterol-raising effect of coffee. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(6), 1277-1283.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131.
- Verhoef, P., Pasman, W. J., van Vliet, T., Urgert, R., & Katan, M. B. (2002). Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(6), 1244-1248.

- Vinson, J. A., Proch, J., Bose, P., Muchler, S., Taffera, P., Shuta, D., y cols. (2006). Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8071-8076.
- Vinson, J. A., Burnham, B. R., & Nagendran, M. V. (2012). Randomized, double-blind, placebo-controlled, linear dose, crossover study to evaluate the efficacy and safety of a green coffee bean extract in overweight subjects. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 5, 21-27.
- Visioli, F., Bernaert, H., Corti, R., Ferri, C., Heptinstall, S., Molinari, E., y cols. (2009). Chocolate, lifestyle, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49 (4), 299-312.
- Vita, J. A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 292S-297S.
- Vitaglione, P., Morisco, F., Mazzone, G., Amoruso, D. C., Ribocco, M. T., Romano, A., y cols. (2010). Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology*, 52(5), 1652-1661.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 829-837.
- Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., & Walle, U.K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 45-52.
- Wang-Polagruto, J. F., Villablanca, A. C., Polagruto, J. A., Lee, L., Holt, R. R., Schrader, H. R., y cols. (2006). Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 47, S177-S186.
- Watanabe, T., Arai, Y., Mitsui, Y., Kusaura, T., Okawa, W., Kajihara, Y., & Saito, I. (2006). The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 28(5), 439-449.

- Waterhouse, A. L., Shirley, J. R., & Donovan, J. L. (1996). Antioxidants in chocolate. *The Lancet*, 348 (9030), 834.
- Wedick, N. M., Brennan, A. M., Sun, Q., Hu, F. B., Mantzoros, C. S., & van Dam, R. M. (2011). Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 10(1), 93-101.
- Weng, C. J., & Yen, G. C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), 76-87.
- Wenner, C. A., Güler, M. L., Macatonia, S. E., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1996). Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *The Journal of Immunology*, 156(4), 1442-1447.
- Westerterp-Plantenga, M. S., Lejeune, M. P., & Kovacs, E. M. (2005). Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. *Obesity Research*, 13(7), 1195-1204.
- Whelton, P. K., Appel, L. J., Sacco, R. L., Anderson, C. A., Antman, E. M., Campbell, N., & cols. (2012). Sodium, blood pressure, and cardiovascular disease further evidence supporting the American Heart Association sodium reduction recommendations. *Circulation*, 126(24), 2880-2889.
- Williams, C. J., Fargnoli, J. L., Hwang, J. J., Van Dam, R. M., Blackburn, G. L., Hu, F. B., & Mantzoros, C. S. (2008). Coffee consumption is associated with higher plasma adiponectin concentrations in women with or without type 2 diabetes a prospective cohort study. *Diabetes Care*, 31(3), 504-507.
- Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(1), 48-57.
- Wilson, P. W., Garrison, R. J., Kannel, W. B., McGee, D. L., & Castelli, W. P. (1989). Is coffee consumption a contributor to cardiovascular disease? Insights from the Framingham Study. *Archives of Internal Medicine*, 149(5), 1169-1172.
- Wójcicki, J., Sulikowski, T., Wójcicki, M., Drożdżik, M., Gawrońska-Szklarz, B., Barcew-Wiszniewska, B., & cols. (1996). Pharmacokinetics of phenazone (antipyrine) in rabbits with experimental common bile duct obstruction. *British Journal of Pharmacology*, 117(1), 1-4.

- Wong, C. K., Ho, C. Y., Ko, F. W. S., Chan, C. H. S., Ho, A. S. S., Hui, D. S. C., & Lam, C. W. K. (2001). Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical and Experimental Immunology*, 125(2), 177-183.
- Woollett, L. A., Spady, D. K., & Dietschy, J. M. (1992). Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *Journal of Lipid Research*, 33(1), 77-88.
- Wu, H., Dwyer, K. M., Fan, Z., Shircore, A., Fan, J., & Dwyer, J. H. (2003). Dietary fiber and progression of atherosclerosis: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(6), 1085-1091.
- Wu, J. N., Ho, S. C., Zhou, C., Ling, W. H., Chen, W. Q., Wang, C. L., y cols. (2009). Coffee consumption and risk of coronary heart diseases: a meta-analysis of 21 prospective cohort studies. *International Journal of Cardiology*, 137(3), 216-225.
- Yamaguchi, T., Chikama, A., Mori, K., Watanabe, T., Shioya, Y., Katsuragi, Y., & Tokimitsu, I. (2008). Hydroxyhydroquinone-free coffee: a double-blind, randomized controlled dose-response study of blood pressure. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(6), 408-414.
- Yamashita, K., Yatsuya, H., Muramatsu, T., Toyoshima, H., Murohara, T., & Tamakoshi, K. (2012). Association of coffee consumption with serum adiponectin, leptin, inflammation and metabolic markers in Japanese workers: a cross-sectional study. *Nutrition and Diabetes*, 2(4), e33.
- Yamauchi, R., Kobayashi, M., Matsuda, Y., Ojika, M., Shigeoka, S., Yamamoto, Y., y cols. (2010). Coffee and caffeine ameliorate hyperglycemia, fatty liver, and inflammatory adipocytokine expression in spontaneously diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5597-5603.
- Yang, C. S., Lee, M. J., & Chen, L. (1999). Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 8(1), 83-89.
- Yasuda, A., Natsume, M., Sasaki, K., Baba, S., Nakamura, Y., Kanegae, M., & Nagaoka, S. (2008). Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet. *Biofactors*, 33(3), 211-223.

- Yasuda, A., Natsume, M., Osakabe, N., Kawahata, K., & Koga, J. (2011). Cacao polyphenols influence the regulation of apolipoprotein in HepG2 and Caco2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1470-1476.
- Yukawa, G. S., Mune, M., Otani, H., Tone, Y., Liang, X. M., Iwahashi, H., & Sakamoto, W. (2004). Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry (Moscow)*, 69(1), 70-74.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanus, F., y cols. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*, 364(9438), 937-952.
- Zambonin, C. G., Aresta, A., & Palmisano, F. (2004). Determination of methylxanthines in urine by liquid chromatography with diode array UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(3), 621-624.
- Zamora-Ros, R., Forouhi, N. G., Sharp, S. J., González, C. A., Buijsse, B., Guevara, M., y cols. (2013). The Association Between Dietary Flavonoid and Lignan Intakes and Incident Type 2 Diabetes in European Populations The EPIC-InterAct study. *Diabetes Care*, 36(12), 3961-3970.
- Zampelas, A., Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., & Stefanadis, C. (2004). Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 862-867.
- Zandvliet, A. S., Huitema, A. D., De Jonge, M. E., Den Hoed, R., Sparidans, R. W., Hendriks, V. M., y cols. (2005). Population pharmacokinetics of caffeine and its metabolites theobromine, paraxanthine and theophylline after inhalation in combination with diacetylmorphine. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96(1), 71-79.
- Zevin, S., & Benowitz, N. L. (1999). Drug interactions with tobacco smoking. *Clinical Pharmacokinetics*, 36(6), 425-438.
- Zhang, W. L., Lopez-Garcia, E., Li, T. Y., Hu, F. B., & Van Dam, R. M. (2009). Coffee consumption and risk of cardiovascular events and all-cause mortality among women with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 52(5), 810-817.

- Zhang, Z., Hu, G., Caballero, B., Appel, L., & Chen, L. (2011). Habitual coffee consumption and risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(6), 1212-1219.
- Zhao, Z., Shin, H. S., Satsu, H., Totsuka, M., & Shimizu, M. (2008). 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress-and TNF- α -induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3863-3868.
- Zhao, Y., Wang, J., Ballevre, O., Luo, H., & Zhang, W. (2011). Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertension Research*, 35(4), 370-374.
- Zydron, M., Baranowski, J., & Baranowska, I. (2004). Separation, pre-concentration, and HPLC analysis of methylxanthines in urine samples. *Journal of Separation Science*, 27(14), 1166-1172.

ANEXO 1

Tabla 39. Alimentos no permitidos, restringidos y permitidos durante el estudio crónico Cacao-Salud.

GRUPO DE ALIMENTOS	NO PERMITIDO	RESTRINGIDO	PERMITIDO
Verduras, hortalizas y tubérculos	Remolacha, cebolla cruda	Cebolla sofrita	Calabaza, guisante, habas, lechuga, judías verdes, pimiento, ajo, apio, cardo, puerro, col, coles de Bruselas, repollo, champiñón y otras setas, espárragos, espinacas, pepino, rábano, escarola, canónigos, coliflor, nabo, calabacín, tomate, endivia, zanahoria, batata, patata, rúcula, algas
Frutas	Fresa, fresón, frutos del bosque, naranja, manzana, mandarina, uva		Kiwi, aguacate, chirimoya, higo, melón, piña, plátano, sandía, limón, membrillo, nectarina, pera, mango, papaya
Legumbres	Soja, derivados de soja		Lentejas, guisante seco, garbanzo
Cereales			Pasta, pan blanco de trigo blanco o integral, harina de trigo refinada o integral, cereales, maíz, arroz
Frutos secos			Caca huete, avellana, castaña, nuez, almendra, pipas de girasol
Bebidas	Zumos, batidos de chocolate, refrescos de frutas no permitidas, vino, mosto, té, infusión de yerba mate		Agua, zumos naturales de frutas permitidas, bebidas isotónicas (<i>Aquarius</i>), refrescos sabor cola, infusiones
Grasas/aceites	Aceite de soja		Aceite de girasol, oliva, mantequilla, margarina, mantecas
Dulces	Mermeladas de frutas no permitidas, productos con cacao o chocolate		Mermeladas de las frutas permitidas, galletas, cereales o bizcochos, azúcar, edulcorante, dulce de membrillo
Carnes, pescados, huevos y derivados	Aquellas preparadas con alimentos no permitidos		<u>TODAS</u>
Lácteos y derivados	Batidos o yogures de sabores o con pedazos de frutas no permitidas		Leche, batidos de leche con alimentos permitidos, yogures naturales y otros postres lácteos de sabores o con trozos de frutas permitidas, queso
Alimentos precocinados	Aquellos preparados con alimentos no permitidos		

Tabla 40. Alimentos no permitidos, restringidos y permitidos durante el estudio crónico Café-Infu-Salud.

GRUPO DE ALIMENTOS	NO PERMITIDO	RESTRINGIDO (1 VEZ/SEMANA)	PERMITIDO
Verduras, hortalizas y tubérculos	Acelga, alcachofa, berenjena, brócoli, chufa	1 patata ó 150g patatas fritas o 200g patata cocida, cebolla y cebolleta (usar la mínima cantidad posible para cocinar)	Calabaza, guisante, habas, lechuga, judías verdes, pimiento, ajo, apio, cardo, puerro, col, coles de Bruselas, repollo, champiñón y otras setas, espárragos, espinacas, grelos, pepino, rábano, escarola, canónigos, coliflor, nabo, brotes de soja, calabacín, tomate, endivia, remolacha, zanahoria, batata, rúcula, algas, chile
Frutas	Albaricoque, cereza y picota, ciruela, ciruela pasa, frutos del bosque, níspero, pasa (uva), uva, arándanos, naranja	Aceitunas, fresa y fresón (= 100g) manzana pelada, melocotón pelado, paraguay pelada, granada, mandarina, pomelo	Kiwi, aguacate, chirimoya, higo y breva, melón, piña, plátano, sandía, limón, dátil, membrillo, nectarina, pera, mango, papaya, lichi, kaki
Legumbres	Judías o frijoles		Lentejas, guisante seco, garbanzo, soja en legumbre
Cereales	Germen y sémola de trigo, pan de centeno, muesli, <u>TODOS</u> los productos integrales (cereales del desayuno integrales, galletas integrales, harina integral, arroz integral...), avena, pan con semillas (tipo hamburguesa...), cereales de maíz (tipo corn flakes)	Maíz, arroz (= 85g)	Pasta (excepto la integral), pan blanco de trigo (barra normal), harina de trigo refinada, cereales de trigo inflado
Frutos secos	Pipas de girasol, almendra, orejones		Cacahuete, avellana, castaña, nuez
Bebidas	Café (de todos los tipos: soluble, descafeinado, en grano...), batidos de chocolate, cereales solubles (tipo <i>Eko</i> , etc.), Refrescos de frutas no permitidas (manzana, uva...). Vino, bebidas con sabor a té (<i>Nestea</i>), cola (<i>Coca-cola</i>), bebidas energéticas (<i>Redbull</i> , <i>Bum</i>) y otras (<i>Guaraná</i>), horchata	Leche con cacao soluble (<u>1 vaso/día</u>)	Agua, zumos naturales de frutas permitidas y también zumo de naranja, cerveza, champagne, leche de soja, ron, whisky, bebidas isotónicas (<i>Aquarius</i>), refrescos sabor cola sin cafeína (<i>Coca-cola sin cafeína</i>)
Grasas/aceites	Aceite de girasol, de soja, de maíz o de colza		Aceite de oliva, mantequilla, margarina, mantecas
Espicias, condimentos salsas	<u>CASI TODAS</u> (menta y hierbabuena, romero, albahaca, orégano, canela, nuez moscada, anís estrellado, jengibre, cardamomo, perejil, clavo,		Ajo y cebolla en polvo, sal, vinagre, pimienta, mostaza, curry (una pizca). Ketchup, mayonesa hecha con aceite de oliva

	cilantro, etc...), miso		
Infusiones	Té, mate, manzanilla, infusiones de frutos del bosque, melisa, <i>Ginkgo biloba</i> , hipérico, hierba luisa, eucalipto, romero		Anís, tila, cardamomo, cola de caballo, salvia, menta, bardana, tomillo, mejorana, hinojo
Dulces	Mermeladas de frutas no permitidas, bollos o bizcochos elaborados con harina integral, galletas integrales, chocolate negro o puro, miel	Chocolate con leche (= 20g ó 4 onzas)	Mermeladas de las frutas permitidas, galletas, cereales o bizcochos elaborados con harinas refinadas, caramelos de sabores de frutas permitidas, azúcar, edulcorante, dulce de membrillo, chocolate blanco
Carnes, pescados, huevos y derivados	Aquellas preparadas con alimentos no permitidos (Ej.: pollo relleno de ciruelas pasas, merluza frita en aceite de girasol, judías...)		<u>TODAS</u>
Lácteos y derivados	Batidos o yogures de sabores o con pedazos de frutas no permitidas		Leche, batidos de leche con alimentos permitidos, yogures naturales y otros postres lácteos de sabores o con trozos de frutas permitidas, cuajada, queso..., leche de soja
Alimentos precocinados	Aquellos preparados con alimentos no permitidos		

